

Contribuição para o estudo dos mecanismos de resistência ao glifosato em *Conyza canadensis*

David Marciano da Conceição Domingos

Dissertação para a obtenção do Grau de Mestre em
Engenharia Agronómica – Proteção de Plantas

Orientador: Professora Doutora Ana Maria da Silva Monteiro

Coorientadores: Doutora Eugénia Maria Antunes de Andrade
Doutora Isabel Maria da Silva Monteiro Miranda Calha

Júri:

Presidente: Professora Doutora Cristina Maria Moniz Simões Oliveira, Professora Associada com agregação do Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa

Vogais: Doutora Isabel Maria da Silva Monteiro Miranda Calha, Investigadora Auxiliar do Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária

Doutor João Martim de Portugal e Vasconcelos Fernandes, Professor Adjunto da Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Beja

Agradecimentos

Nas linhas seguintes expresso os meus sinceros agradecimentos:

Aos meus pais, por constituírem os pilares do meu desenvolvimento académico e pessoal.

À Professora Ana Monteiro, minha orientadora, por me ter sensibilizado para esta temática e por todo o apoio científico prestado.

À Doutora Isabel Calha, minha coorientadora, pela sua competência e apoio científico prestado ao longo de todo o trabalho, pela sua constante e total disponibilidade em esclarecer e orientar eficazmente, por tudo o que me ensinou e pelo seu valioso contributo para a minha formação académica.

À Doutora Eugénia Andrade, minha coorientadora, pelo apoio e partilha de conhecimentos importantes para a compreensão e resolução de problemas inerentes à atividade científica.

À Bolseira de Investigação Mónica Rodrigues, pelo valioso apoio técnico e científico prestado e pela constante contribuição através da sua experiência e conhecimento, os quais foram decisivos para a concretização deste trabalho.

À Engenheira Clara Fernandes, pelo auxílio constante e suporte técnico, que muito contribuíram para a evolução do trabalho.

Ao Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária (INIAV), onde realizei a parte experimental desta dissertação.

À Engenheira Susana Luz e à Técnica de Laboratório Teresa Santos, pelo auxílio prestado no Laboratório de Resíduos e Pesticidas (LRP) / INIAV, e ao meu antigo colega Filipe Santos, pela sua prontidão em ajudar.

Ao projeto “Rede para a Monitorização e Divulgação das melhores práticas Agroambientais para o Olival” (REMDA-Olival, programa PRODER – Medida 4.2. Formação e informação especializada, Ação 4.2.2. Redes Temáticas de Informação e Divulgação) que financiou parcialmente este estudo.

Dedico esta dissertação à memória do meu amigo Amável Rústico

Resumo

Esta dissertação consiste no relato do estudo de dois mecanismos de resistência numa população de *Conyza canadensis* resistente ao glifosato (B15), comparativamente a uma população sensível (B), provenientes de olivais intensivos no Alentejo. Começou-se por confirmar a presença de resistência através de um ensaio de acumulação de shiquimato em discos de folhas. Seguidamente, procedeu-se à sequenciação do gene que codifica para a enzima 5-enolpiruvilshiquimato-3-fosfato sintase (EPSPS) e, finalmente, à determinação dos níveis expressão deste gene.

O ensaio de determinação de shiquimato evidenciou uma maior acumulação de shiquimato na população B relativamente à população B15, após 24 horas de exposição ao glifosato. A sequenciação do cDNA produzido a partir do gene codificador da EPSPS-2 não revelou diferenças na constituição da enzima nas duas populações. A análise da expressão génica também não revelou diferenças nos níveis de expressão desta enzima, 24 horas após a aplicação de glifosato.

Estes resultados sugerem que a população em estudo (B15) não apresenta mutação nem sobre-expressão do gene codificador da enzima EPSPS-2 como mecanismo de resistência ao glifosato.

Palavras-chave: resistência, glifosato, *Conyza canadensis*, shiquimato, EPSPS.

Abstract

This dissertation reports the study of two resistance mechanisms in a glyphosate-resistant *Conyza canadensis* population (B15), comparatively with a susceptible population (B), from intensive olive orchards in Alentejo (south of Portugal). Initially, the presence of resistance was confirmed by a shikimate leaf disc assay. Then, the sequence of the gene encoding the enzyme 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase (EPSPS) was determined and, lastly, were analysed the expression levels of the gene encoding this enzyme.

The shikimate leaf disc assay showed a higher accumulation of shikimate in the population B, relatively to population B15, 24 hours after being exposed to glyphosate. The EPSPS-2 cDNA sequencing didn't reveal differences in enzyme's constitution between the two populations. The analysis of gene expression also revealed no differences in expression levels of this enzyme, 24 hours after glyphosate application.

These results suggest that the studied population has no EPSPS enzyme mutation or overexpression as a mechanism of resistance to glyphosate.

Keywords: resistance, glyphosate, *Conyza canadensis*, shikimate, EPSPS.

Extended Abstract

The continuous application of herbicides with the same mode of action, in the same fields, year after year, has resulted in an increasing number of species with acquired resistance to the most of herbicides used worldwide (Nandula, 2010). Nowadays are known 238 different herbicide resistant species, of which 31 are glyphosate resistant (Heap, 2014). In 1996, the first case of glyphosate resistance was reported, more than twenty years after its commercialization. In Portugal, the first case of glyphosate resistance occurred in 2010 in populations of *Conyza bonariensis* (L.) Cronq. (Calha e Osuna, 2010).

The aim of this work was to contribute for the study of the herbicide resistance mechanisms, more precisely the mechanisms of glyphosate resistance in *Conyza canadensis* (L.) Cronquist. *C. canadensis* is a species from North America, considered a weed, but naturalized in Portugal (Mendes, 2011). Two populations of this weed species from intensive olive orchards in Alentejo (south of Portugal) were studied: a previously confirmed resistant population (B15) and a susceptible one (B), with no previous glyphosate historic.

For such purpose, two DNA based assays were carried out and one indirect metabolism based assay. In the indirect assessment, the shikimate accumulation rates in leaf discs of the two studied populations, 24 hours after exposure to different glyphosate concentrations, namely 0, 0,9, 1,8, 3,6, 9, 18 and 36 mg a.e. L⁻¹, were determined via spectrophotometric assay. In the two DNA based assays the mutation in the EPSPS-2 enzyme coding gene and the overexpression of this gene were assessed, as potential mechanisms leading to glyphosate resistance. In the first case, for both studied populations, the nucleotide sequence of a cDNA fragment containing 1200 bp was assessed by sequencing. In the second case, the relative expression levels of the *epsps-2* coding gene in these populations were determined by real time polymerase chain reaction, using as reference the *elongation factor 1 α* coding gene.

The results of shikimate leaf disk assay for early detection of glyphosate resistance showed a higher shikimate accumulation rate in the resistant biotype comparatively to the susceptible biotype - 21 times higher fitting a linear model and 20 times higher fitting a linear model. The cDNA sequencing revealed no mutations in the *epsps-2* coding gene leading to functional modifications in the protein. The sequences obtained were aligned with known sequences of other species and the amino acid proline 106, which nucleotide sequence changing was related as the cause of enzyme EPSPS-2 insensibility to glyphosate, was unchanged, as well as other amino acids responsible for this EPSPS-2 insensibility observed in site-directed mutagenesis studies and expression in *E. coli* and in

transgenic plants. The *epsps*-2 enzyme coding gene also showed no significant differences between the expressions levels in the two studied populations.

Even though that these results confirmed the presence of resistance in B15 population, they also suggest that the EPSPS-2 enzyme insensibility or the corresponding coding gene overexpression are not possible mechanisms leading to glyphosate resistance in these population. Consequently, this population has a non-target site mechanism. Other mechanisms could be considered, such as a limited translocation caused by sequestration of glyphosate in the vacuole.

This work was the first biomolecular approach applied to the study of resistance mechanisms in *C. canadensis* held in Portugal. The biomolecular tools used here, could be applied in the further studies of others potential mechanisms in *C. canadensis* and others weeds. Considering these results, the relative expression of the M10 and M11 ATP-binding cassette transporters genes will be a worthy starting point in a future study.

Índice

Agradecimentos	2
Resumo.....	3
Abstract	4
Extended Abstract	5
Índice de figuras	9
Índice de quadros.....	10
Lista de abreviaturas	11
1. Introdução	12
I - Revisão bibliográfica.....	14
2. Resistência adquirida a herbicidas	14
2.1. Definição de resistência	14
2.2. Fatores de risco	15
2.3. Medidas de controlo	15
2.4. <i>Conyza canadensis</i> (L.) Cronquist (avoadinha).....	21
2.4.1. Taxonomia e distribuição	21
2.4.2. Biologia.....	21
2.4.3. Germinação	24
2.5. Resistência a herbicidas	25
2.6. Meios de controlo	25
2.7. Glifosato	26
2.7.1. Propriedades químicas	26
2.7.2. Modo de ação e comportamento nas plantas	28
2.7.3. Comportamento no solo e na água.....	30
2.7.4. Riscos para o homem e outros animais	32
2.8. Mecanismos de resistência	32
2.8.1. Principais mecanismos de resistência em plantas infestantes	32
2.8.2. Mecanismos de resistência ao glifosato em <i>C. canadensis</i>	34
2.8.3. Fatores que afetam a resistência e consequências fisiológicas	37
2.8.4. Métodos de determinação dos mecanismos de resistência	38
2.8.4.1. Ensaios com planta inteira	39
2.8.4.2 Ensaios com sementes em placa de Petri	39
2.8.4.3 Ensaios com folhas destacadas ou discos de folhas.....	40

2.8.4.4. Ensaio baseado no metabolismo (via do shiquimato)	40
2.8.4.5 Ensaio <i>in vitro</i>	41
2.8.4.6. Métodos baseados no DNA.....	42
II. Materiais e métodos	46
3.1. Ensaio de determinação dos mecanismos de resistência	46
3.2. Material vegetal	46
3.3. Ensaio de determinação de shiquimato.....	46
3.4. Sequenciação do gene da EPSPS-2.....	47
3.4.1. Sequenciação de DNA	47
3.4.2. Seleção de “primers”	49
3.4.3. Quantificação do DNA	50
3.4.4. Sequenciação de cDNA.....	50
3.4.5. Separação dos fragmentos de DNA e cDNA.....	51
3.5. Ensaio de determinação da expressão génica	51
3.6. Análise estatística.....	53
III – Resultados e discussão	54
4.1. Ensaio de determinação do shiquimato.....	54
4.2. Sequenciação do gene da EPSPS-2.....	57
4.2.1. Sequenciação de DNA	57
4.2.2. Seleção de “primers”	59
4.2.3. Quantificação do DNA	60
4.2.4. Amplificação do fragmento de 1200 pb.....	61
4.3. Ensaio de determinação da expressão génica	64
4.3.1. Ensaio de otimização	64
4.3.2. Ensaio definitivos.....	65
IV – Conclusões.....	71
Referências bibliográficas.....	72
Anexos	81

Índice de figuras

Figura 1. Aspetos morfológicos das folhas e caules (indumento), inflorescência e capítulos de <i>Conyza canadensis</i> (L.) Cronq.	23
Figura 2. Mapa mundial dos casos de resistência adquirida ao glifosato	27
Figura 3. Casos de resistência ao glifosato por espécies	28
Figura 4. A via do shiquimato, a sua relação com outras vias metabólicas e o sítio da sua inibição pelo glifosato..	29
Figura 5. Vias de degradação do glifosato..	31
Figura 6. Evolução da acumulação do shiquimato nos discos de folhas de <i>Conyza canadensis</i> , na presença de baixas concentrações de glifosato.	54
Figura 7. Evolução da acumulação do shiquimato nos discos de folhas de <i>Conyza canadensis</i> , na presença de altas concentrações de glifosato.....	55
Figura 8. Perfil eletroforético correspondente ao fragmento de DNA de cloroplasto..	57
Figura 9. Perfil eletroforético obtido para a PCR de EPSPS-2 com gradiente de temperatura e duas concentrações diferentes de Mg^{2+}	58
Figura 10. Perfil eletroforético obtido para a PCR de EPSPS-2 usando os “primers” EPS-1200, com gradiente de temperatura.....	62
Figura 11. Perfil eletroforético correspondente aos fragmentos de cDNA amplificados por PCR em tempo real.	69

Índice de quadros

Quadro 1. Sinonímia, nomes vulgares e caracterização morfológica de <i>Conyza canadensis</i> e <i>Conyza bonariensis</i>	23
Quadro 2. Síntese dos mecanismos de resistência ao glifosato identificados nas principais infestantes resistentes ao glifosato	33
Quadro 3. Composição das soluções dos padrões de λ DNA e do controlo negativo.	50
Quadro 4. Parâmetros analisados na otimização do ensaio de determinação da expressão génica e respetivos resultados.....	52
Quadro 5. Equações lineares e logarítmicas correspondentes à acumulação de shiquimato nos discos de folhas de <i>Conyza canadensis</i>	56
Quadro 6. Alinhamento das sequências codificantes obtidas com a sequência codificante no sentido “forward” (5’-3’) da EPSPS-2 de <i>Conyza Canadensis</i>	59
Quadro 7. Quadro-resumo dos “primers” usados	59
Quadro 8. Absorvâncias das amostras de DNA extraído de folhas de indivíduos das populações S e B4 de <i>C. canadensis</i>	60
Quadro 9. Composição das soluções das amostras e concentrações de DNA obtidas pelo método do PicoGreen.	61
Quadro 10. Sequência de aminoácidos e nucleótidos correspondentes ao cDNA codificador da EPSPS-2, isolado a partir dos biótipos B e B15 e alinhado com as sequências conhecidas de outras espécies.	63
Quadro 11. Expressão relativa do gene <i>epsps-2</i> em tecidos de <i>C. canadensis</i> de um indivíduo suscetível e um resistente ao glifosato não submetidos a AH, e de indivíduos suscetíveis e resistentes 24 e 48 horas após serem submetidos a AH.	65
Quadro 12. Expressão relativa do gene <i>epsps-2</i> em tecidos (folhas) de <i>C. canadensis</i> de três indivíduos suscetíveis (S1, S2 e S3) e três indivíduos resistentes (R1, R2 e R3), 24 horas AAH.	66
Quadro 13. Valores calculados de ΔC_T (variação do ciclo térmico) e $2^{-\Delta\Delta C_T}$ relativos à expressão relativa do gene <i>epsps-2</i> em tecidos de <i>C. canadensis</i> de três indivíduos suscetíveis (S1, S2 e S3) e três indivíduos resistentes (R1, R2 e R3), 24 horas AAH.	67
Quadro 14. Expressão relativa do gene <i>epsps-2</i> e valores calculados de ΔC_T (variação do ciclo térmico) e $2^{-\Delta\Delta C_T}$ para tecidos (folhas) de <i>C. canadensis</i> de quatro indivíduos suscetíveis (S1, S2, S3 e S4) e quatro indivíduos resistentes (R1, R2, R3 e R4), 24 horas AAH, e sem aplicação (SH).	68
Quadro 15. Variância das médias dos C_T dos indivíduos suscetíveis S1, S2 E S3 (S), e dos indivíduos resistentes R1, R2 E R3 (R), correspondentes aos “primers” usados nos ensaios 1 e 2.	69

Lista de abreviaturas

AAH	Após a aplicação de herbicida
AH	Aplicação de herbicida
ACCase	Acetil-CoenzimaA carboxilase
ALS	Aceto-lactato sintase
AMPA	Ácido aminometilfosfónico
ANOVA	Análise de Variância
As β	Aminodesoxicorismato sintase β
ABC	ATP-binding cassette
BPC	Boas Práticas Culturais
cit-P450	citocromo P450 monoxigenase(s)
DAA	Dia(s) após a aplicação
DHD	Desidroquinato desidratase
ED ₅₀	Dose que provoca uma redução de 50% na biomassa ou acumulação de shiquimato em 50%
EPSP	Enolpiruvilshiquimato-3-fosfato
EPSPS	5-enolpiruvilshiquimato-3-fosfato sintase(s)
E4P	D-eritrose 4-fosfato
INIAV	Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária
GOX	Oxidoredutase
GST	Glutathione-S-transferase
HRAC	Herbicide Resistance Action Committee
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
LRP	Laboratório de Resíduos e Pesticidas
MDA	Modo(s) de ação
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
PCR	Polymerase Chain Reaction
PEP	Fosfoenolpiruvato
R	Resistente(s)
RG	Resistente(s) ao glifosato
RMD	Resistente(s) ao glifosato por mecanismo desconhecido
RTR	Resistente(s) ao glifosato por translocação reduzida
S	Suscetível(is)
SDH	Shiquimato desidrogenase
S3P	Shiquimato-3-fosfato
TS α	Triptofano sintase α
WSSA	Weed Science Society of America

1. Introdução

A aplicação sistemática de herbicidas com o mesmo modo de ação, nos mesmos campos, ano após ano, tem conduzido ao aparecimento de um número cada vez maior de espécies com resistência adquirida à maior parte dos herbicidas utilizados a nível mundial (Nandula, 2010). Conhecem-se atualmente 438 populações resistentes (R) em todo o mundo, associadas a 238 espécies diferentes; destas, 31 espécies apresentam resistência ao glifosato (Heap, 2014). Em 1996, ocorreu o primeiro caso de resistência ao glifosato, mais de 20 anos após a sua comercialização. Um fator que acelerou este processo foi o surgimento das culturas transgênicas resistentes ao glifosato (RG), tais como a soja, o milho, o algodão e a colza (Powles e Yu, 2010).

Em Portugal, a resistência adquirida aos herbicidas foi confirmada, pela primeira vez, em 1995, na cultura do arroz, tendo sido identificadas populações de *Alisma plantago-aquatica* L. resistentes ao herbicida bensulfurão-metilo (Calha *et al.*, 2007). Em 2010, a resistência ao glifosato foi confirmada pela primeira vez em populações de *Conyza bonariensis* (L.) Cronq., em olivais do Alentejo (Calha, 2011). A resistência ao glifosato em Portugal apenas foi relatada em culturas perenes, tais como o olival, a vinha e pomares de fruteiras, com maior incidência em *Lolium* spp. e *Conyza* spp. (Mendes, 2011; Santos, 2012; Calha e Portugal, 2012).

Atualmente estão identificadas 3 espécies do género *Conyza* em Portugal: *Conyza canadensis* (L.) Cronq. (avoadinha), *C. sumatrensis* (Retznis) Walker (avoadinha-marfim) e *C. bonariensis* (L.) Cronq. (avoadinha-peluda). Também estão identificados híbridos: *C. x rouyana* Sennen (*C. albida* x *canadensis*) e *C. x mixta* Fouc. e Neyr. (*C. bonariensis* x *canadensis*) (Franco, 1984).

A espécie *C. canadensis* (L.) Cronquist é originária da América do Norte, considerada infestante, mas naturalizada em Portugal. Encontra-se distribuída por todo o país e afeta numerosas culturas anuais e perenes e zonas não cultivadas (Mendes, 2011). O controlo de *C. canadensis* é realizado fundamentalmente com herbicidas. Normalmente o glifosato é o herbicida mais utilizado em pomares de fruteiras, nas quais esta infestante se tem destacado (Vidal *et al.*, 2007).

As infestantes resistentes podem sobreviver à aplicação de herbicidas através de diversos mecanismos. O conhecimento destes mecanismos de resistência apresenta-se como uma ferramenta importante na abordagem integrada à gestão da resistência, pois permitem decidir com maior precisão quais estratégias a serem aplicadas (Délye *et al.*, 2013).

O modo de ação do glifosato é ímpar, pois é o único herbicida inibidor da enzima 5-enolpiruvilshiquimato-3-fosfato sintase (EPSPS), impedindo, assim, a síntese dos aminoácidos aromáticos fenilalanina, tirosina e triptofano, os quais são essenciais para a síntese de proteínas (Zablotowicz e Reddy, 2004).

A presença de resistência ao glifosato em *C. canadensis* tinha sido previamente confirmada numa população proveniente de um olival intensivo em Ferreira do Alentejo (Mendes, 2011), mas o mecanismo fisiológico e bioquímico responsável pela resistência era desconhecido. Este trabalho teve como objetivo estudar alguns dos potenciais mecanismos de resistência ao glifosato nessa população de *C. canadensis*. Para tal, foi utilizado o ensaio de determinação do shiquimato que, para além de ser um método expedito de confirmação da resistência ao glifosato, permite avaliar indiretamente o mecanismo de resistência ao glifosato, e foram realizados estudos biomoleculares para a) deteção de eventual mutação pontual, através da sequenciação do gene que codifica o enzima alvo onde atua o glifosato (EPSPS) e b) sobre-expressão do enzima EPSPS, com ensaios de determinação da expressão do mesmo gene.

A componente prática deste trabalho é antecedida por uma revisão bibliográfica, dividida em quatro capítulos: no primeiro capítulo é abordada a temática da resistência adquirida a herbicidas; no segundo apresentam-se as características relevantes da espécie em estudo (*C. canadensis*), o seu estado face ao fenómeno da resistência e atuais meios de controlo; no terceiro destacam-se os principais aspetos relativos ao herbicida glifosato; e, por último, um capítulo mais alargado dedicado aos mecanismos de resistência, com destaque para os métodos de determinação destes mecanismos.

Este trabalho constituiu a primeira abordagem biomolecular aplicada ao estudo dos mecanismos de resistência em *C. canadensis* realizada em Portugal. Neste estudo, foi analisada a presença de dois possíveis mecanismos nesta infestante. Futuramente, recorrendo às ferramentas da biologia molecular utilizadas, poder-se-ão determinar outros mecanismos passíveis de ocorrerem em *C. canadensis* e noutras infestantes das áreas agrícolas nacionais e, desta forma, adquirir conhecimentos que permitam uma melhor gestão da resistência.

I - Revisão bibliográfica

2. Resistência adquirida a herbicidas

2.1. Definição de resistência

A Weed Science Society of America (WSSA) definiu resistência a herbicidas como “a capacidade hereditária de uma planta de sobreviver e reproduzir-se após a exposição a uma dose de herbicida normalmente letal para a variante selvagem. Numa planta, a resistência pode ocorrer naturalmente ou ser induzida por técnicas tais como a engenharia genética ou a seleção de variantes produzidas por cultura de tecidos ou mutagénese”. Quanto à tolerância a herbicidas, a WSSA define esta como “a habilidade herdada de uma espécie de sobreviver e de reproduzir-se após a aplicação dum herbicida. Isto implica que não houve seleção ou manipulação genética para tornar a planta tolerante; ela é naturalmente tolerante” (WSSA, 1998).

As infestantes podem ser resistentes a mais do que um herbicida através de mecanismos de resistência cruzada e/ou de resistência múltipla. Hall *et al.* (1994) definem resistência cruzada como a expressão de um mecanismo que fornece a capacidade de resistir a herbicidas de classes químicas diferentes, e resistência múltipla como a expressão, em indivíduos ou populações, de mais de um mecanismo de resistência que fornecem a capacidade de resistir a herbicidas de diferentes classes químicas.

Heap (2005) distingue “definição científica” de “definição agronómica” de resistência. A definição científica não considera a dose recomendada do herbicida, dado que esta pode controlar identicamente uma população suscetível (S) e uma resistente (R) em campo, mas abarca subdoses da dose recomendada que originam diferenças no controlo das duas populações. A definição agronómica, considera que para haver resistência é necessário que uma dada população sobreviva após a aplicação da dose recomendada de herbicida nas condições de campo.

A tolerância é a capacidade inata de uma espécie em sobreviver após a exposição a um herbicida. Esta faculdade é independente de exposições anteriores a herbicidas e relaciona-se com a variabilidade genética da espécie. Ou seja, numa dada população de plantas existem aquelas que são naturalmente mais ou menos tolerantes a um dado herbicida. A tolerância difere da resistência pois esta é a capacidade adquirida de alguns biótipos, de uma população de plantas, sobreviverem a exposições a herbicidas que, em condições normais, controlam os restantes membros da população. A resistência pode ocorrer naturalmente (seleção) ou ser induzida por técnicas de engenharia genética, cultura de tecidos ou de agentes mutagénicos (Silva *et al.*, 2007).

2.2. Fatores de risco

O risco de uma área ser infestada por plantas resistentes a herbicidas depende i) da probabilidade de seleção de mutantes resistentes a um dado mecanismo de ação herbicida e ii) da probabilidade dos mutantes selecionados colonizarem uma dada área. O primeiro fator relaciona-se com a genética das populações e com a pressão de seleção, enquanto o segundo está relacionado com a adaptabilidade dos indivíduos selecionados (Vidal e Fleck, 1997).

Antes da exposição a um herbicida é provável de existam biótipos resistentes, em frequências variáveis e reduzidas. A variabilidade genética é provavelmente o principal fator de risco de ocorrência de resistência a herbicidas em infestantes. A resistência não é induzida pelos herbicidas, mas ocorre naturalmente em populações com variabilidade genética (Holt *et al.*, 1993). A frequência inicial de biótipos resistentes também é determinante para o desenvolvimento de resistência; contudo, é de difícil determinação, pelo facto de ser influenciada por diversos fatores, tais como a pressão de seleção, as características genéticas da resistência e a dinâmica populacional das infestantes (Christoffoleti *et al.*, 1994).

A pressão de seleção refere-se à aplicação repetitiva do herbicida na dose recomendada, ou seja, à intensidade do uso, eficácia e persistência do herbicida, e que irá alterar a proporção relativa de indivíduos R e S existentes antes e após a aplicação de herbicida (AAH) (Gressel, 1991). Esta também pode ser alterada pelo padrão de emergência da infestante e pela eficiência dos meios de controlo não-químicos (Rubim, 1991).

A adaptabilidade define-se geralmente como a proporção de alelos que um único indivíduo representa no conjunto de genes da população e depende da capacidade de sobrevivência e do sucesso reprodutivo (Silvertown, 1987). A determinação da adaptabilidade normalmente é feita com base na comparação da taxa de germinação, crescimento, produção de biomassa e produção de sementes entre biótipos R e S. Contudo, estes estudos normalmente são feitos sob condições controladas, tornando bastante difícil a determinação da adaptabilidade sob condições de campo (Holt, 1990).

2.3. Medidas de controlo

O controlo preventivo de infestantes baseia-se em práticas que dificultam a introdução, o estabelecimento e/ou a disseminação em áreas ainda não infestadas. As práticas culturais aproveitam as características da planta cultivada ou do seu processo de cultivo e, por vezes, são suficientemente eficazes de modo a dispensarem outros meios de controlo. Uma das técnicas

culturais consiste no sombreamento da superfície do solo, de modo a dificultar o desenvolvimento das infestantes. Isto pode ser conseguido através de uma melhor distribuição espacial das plantas (Jakelaitis *et al.*, 2001) ou através do uso de cultivares de crescimento rápido. Para tal, devem ser usadas sementes e plantas transplantadas de elevado vigor, realizar a sementeira na época recomendada e nos compassos e densidades adequados, proceder à fertilização e rega equilibradas e seguir os princípios da proteção integrada na proteção fitossanitária das culturas (Fontes *et al.*, 2003).

Segundo os artigos 4º e 5º do Decreto-Lei nº 256/2009 de 24-09-2009, a proteção integrada consiste na avaliação ponderada de todos os métodos de proteção das culturas disponíveis e a integração de medidas adequadas para diminuir o desenvolvimento de populações de organismos nocivos e manter a utilização dos produtos fitofarmacêuticos e outras formas de intervenção a níveis económica e ecologicamente justificáveis, reduzindo ou minimizando os riscos para a saúde humana e o ambiente, privilegiando o desenvolvimento de culturas saudáveis com a menor perturbação possível dos ecossistemas agrícolas e agro-florestais e incentivando mecanismos naturais de luta contra os inimigos das culturas. Os seus princípios básicos consistem nos seguintes pressupostos:

- Implementação de medidas visando a limitação natural dos inimigos das culturas com vista a prevenir ou evitar o seu desenvolvimento;
- Redução, ao mínimo, das intervenções fitossanitárias nos ecossistemas agrícolas e agro-florestais;
- Utilização de todos os meios de luta disponíveis, integrando-os de forma harmoniosa e privilegiando, sempre que possível, as medidas indiretas;
- Recurso aos meios de luta diretos, nomeadamente o uso de produtos fitofarmacêuticos, quando não haja alternativa;
- Seleção dos produtos fitofarmacêuticos em função da sua eficácia, persistência, custo e efeitos secundários em relação ao homem, aos auxiliares e ao ambiente.

As Boas Práticas Culturais (BPC) descritas por Norsworthy *et al.* (2012) são as seguintes:

1. Compreender a biologia das infestantes presentes. O conhecimento dos requisitos para a germinação das sementes e dos padrões da emergência em função dos fatores ambientais permitem indicar qual a época em que as infestantes apresentam maior probabilidade de emergir e o período de tempo durante o qual as medidas de controlo devem ser mantidas para proporcionar uma eficácia aceitável. Sabe-se que os fenómenos de resistência são mais frequentes em infestantes anuais relativamente às perenes (Heap 2011a), e nas infestantes com maior grau de polinização cruzada,

relativamente às de autopolinização (Jasieniuk *et al.*, 1996). Assim, os estados fenológicos das infestantes mais suscetíveis ao controlo deverão ser identificados. A duração do desenvolvimento reprodutivo, o modo de dispersão e a persistência no banco de sementes do solo são outros indicadores do potencial de desenvolvimento de resistência.

2. Usar uma abordagem diversificada para o controlo de infestantes, centrada na prevenção da produção de sementes e, conseqüentemente, na redução do banco de sementes do solo. Isto porque existe uma associação positiva entre o risco de desenvolvimento da resistência e o tamanho inicial do banco de sementes (Neve *et al.*, 2011). Em geral, as coberturas vegetais (enrelvamento) competem eficazmente com as infestantes, através da redução do banco de sementes e da melhoria das condições físico-químicas do solo. A presença de cobertura morta (palhagem) pode conduzir à instalação de uma elevada quantidade e diversidade de microrganismos responsáveis pela deterioração e conseqüente perda de viabilidade de sementes dormentes. Outras medidas são a elevada densidade de sementeira da cultura e a limpeza das ceifeiras-debulhadoras, para remoção de sementes infestantes introduzidas no interior dos equipamentos durante a colheita (Silva *et al.*, 2007b).

3. O campo deve estar livre de infestantes na altura da sementeira/plantação e depois assegurar que se mantém limpo durante o mais longo período de tempo possível, ou, pelo menos durante o período crítico para a cultura. Para tal e, especialmente, em agricultura de conservação, a mobilização pode ser substituída por herbicidas residuais antes ou durante a sementeira/plantação (Neve *et al.*, 2003b; 2011).

4. Utilizar sementes certificadas de culturas isentas de sementes de infestantes. Esta é uma das principais causas da dispersão das infestantes e, devido à dificuldade em distinguir as sementes das várias espécies, é quase impossível controlar.

5. Observar os campos rotineiramente. Mantendo um inventário das infestantes, localização, densidade e tamanho, é possível uma posterior avaliação da eficácia das práticas prescritas e permite identificar quais os herbicidas mais eficazes para o espectro de infestantes presentes. Se houver suspeita de RH, a produção de sementes de todas as plantas não controladas deve ser interrompida de modo a prevenir a perpetuação da resistência mesmo se, em casos extremos, isto implique a destruição da cultura durante o processo.

6. Usar herbicidas com múltiplos modos de ação (MDA) que sejam eficazes contra a maioria das infestantes problemáticas ou contra aquelas mais propensas a adquirir resistência. Isto, aliado à alternância, a misturas de tanque e a aplicações sequenciais, pode minimizar a pressão de seleção

imposta por um MDA particular e assim retardar a evolução da resistência. Recomenda-se que os herbicidas presentes nas misturas possuam eficácia e persistência semelhantes.

7. Aplicar o herbicida na dose e época de aplicação (estado de crescimento da cultura e das infestantes, estado fenológico) recomendadas no rótulo. Note-se que, frequentemente, o controlo químico pode ser realizado utilizando doses inferiores às rotuladas, o que aparentemente pode ser benéfico. Contudo, estudos recentes confirmaram que a exposição a doses de herbicida suficientemente baixas, de modo a permitir a sobrevivência de uma fração das infestantes, poderá contribuir para o desenvolvimento da resistência. Por exemplo, herbicidas de degradação lenta aplicados no solo podem expor as infestantes a doses sub-letais, permitindo a acumulação gradual de alelos resistentes (Norsworthy *et al.*, 2012; Busi e Powles, 2009).

8. Fomentar as práticas culturais que suprimam as infestantes usando a competitividade da cultura. Algumas destas práticas incluem a seleção da cultivar, a redução do compasso, o aumento da densidade de plantação, o ajustamento das datas da sementeira/plantação, o controlo da rega e dos nutrientes, a aplicação adequada de fertilizantes e a rotação das culturas. Esta última tem-se mostrado particularmente eficaz quando aliada à sementeira direta, sobretudo no controlo de espécies exigentes em luz e de propagação vegetativa (Fontes *et al.*, 2003).

9. Usar práticas de controlo mecânico e biológico quando apropriadas.

As práticas de mobilização devem ser alteradas regularmente, de forma a prevenir a acumulação de sementes de certas espécies de infestantes no banco de sementes do solo. Em geral, à medida que a perturbação do solo diminui, aumenta a dimensão e diversidade do banco de sementes do solo.

Na maioria das culturas agrícolas em Portugal continua a ser muito frequente o recurso à mobilização do solo através da lavoura, por razões económicas, disponibilidade de equipamentos e não existência de herbicidas ou pelos riscos do seu uso. Quando a mobilização do solo é demasiado intensa apresenta o inconveniente de contribuir para i) a compactação do solo e consequente redução da infiltração de água e arejamento; ii) a erosão ao nível superficial, através da destruição dos agregados de terra; iii) aumento da taxa de degradação da matéria orgânica. Estes processos são bastante penalizadores para a fertilidade dos solos e, se ocorrer precipitação após a mobilização do solo torna-se difícil, e por vezes impossível, a passagem das máquinas para a realização de tratamentos fitossanitários (Amaro, 2003).

A cobertura do solo com restos vegetais em camada espessa ou com filme de polietileno é um método eficiente (palhagem). A cobertura do solo diminui a luz que atinge a sua superfície, afetando negativamente as infestantes fotossensíveis e a amplitude das variações da temperatura e da

humidade relativa à superfície do solo, estimulando a germinação das sementes das infestantes, que posteriormente morrem devido à impossibilidade de emergência. Outro meio de controlo físico é a solarização do solo em culturas anuais. Esta técnica consiste na utilização de filmes de polietileno transparente sobre a superfície do solo, humedecida à capacidade de campo, durante os meses mais quentes do ano, a qual provoca o aumento da temperatura, fazendo com que, em solo húmido, as sementes das infestantes germinem e morram de seguida; deve ser feita 60 a 75 dias antes da plantação (Silva *et al.*, 2007b).

10. Prevenir o movimento de sementes de infestantes ou propágulos vegetativos entre campos e dentro do campo. Por exemplo, proceder á limpeza do equipamento, antes da entrada em campo vizinho, em particular das ceifeiras-debulhadoras e alfaías de mobilização do solo.

11. Controlar as sementes infestantes durante e após a colheita para prevenir a acumulação do banco de sementes.

12. Prevenir um influxo de infestantes para o campo através do controlo das infestantes nas suas bordaduras.

Para um controlo mais eficaz da resistência, Norsworthy *et al.* (2012) recomendam:

1. Reduzir o banco de sementes das infestantes através de diversos programas de controlo que minimizem a produção de sementes;

2. Implementar um sistema simplificado de incluir os MDA dos herbicidas no rótulo das embalagens de todos os produtos herbicidas (como o código do Herbicide Resistance Action Committee, HRAC) e realizar uma campanha de sensibilização;

3. Sensibilizar os agricultores e técnicos para o facto de que a descoberta de herbicidas eficazes com novos MDA é um acontecimento raro e que os herbicidas existentes são limitados.

4. Demonstrar os benefícios e os custos da diversidade e pro-atividade dos sistemas de controlo de infestantes para a mitigação da resistência aos herbicidas.

5. Fomentar o desenvolvimento de incentivos, por parte do governo e da indústria, que conservem herbicidas com MDA críticos como forma de estimular/incentivar a adoção de BPC.

6. Assegurar que o herbicida seja aplicado de acordo com as recomendações do rótulo, no que respeita à dose, época de aplicação (estado de crescimento da cultura e das infestantes) e espectro florístico. Quando as misturas de tanque são usadas para controlar a gama de infestantes presentes no campo, cada produto deve ser usado na quantidade específica rotulada, apropriada para as infestantes presentes.

7. Identificar e promover as BPC que melhor se adequem a cada sistema cultural de forma a obter o maior impacto possível.

8. Envolver os setores público e privado na promoção das BPC, incluindo as relativas à utilização apropriada do herbicida.

9. Direcionar o financiamento estatal e da indústria para a pesquisa sobre as lacunas substanciais de conhecimento das BPC para a resistência a herbicidas e para apoiar os serviços de extensão cooperativa enquanto agentes essenciais na educação/formação para a resistência.

Modelos matemáticos poderão ser uma ferramenta no controlo da resistência, embora ainda apresentem limitações práticas. Uma das limitações consiste no facto destes modelos serem parametrizados com bases em dados recolhidos de populações únicas, normalmente sob a forma de médias que não incorporam a variabilidade intrapopulacional. Além disto, as populações de infestantes são demasiado pequenas para representar toda a extensão da variabilidade genética na qual a seleção atua à escala agronómica. Organismos modelo e modelos matemáticos que simulem a evolução da resistência poderão permitir ultrapassar este problema (Neve *et al.*, 2009). Organismos unicelulares, como *Chlamydomonas reinhardtii* P.A. Dangeard, são igualmente suscetíveis a diversos herbicidas, mas apresentam a vantagem de se reproduzirem rapidamente e de se poderem cultivar milhões destes organismos em alguns mililitros de meio líquido (Neve *et al.*, 2009). Outros organismos, como *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh, também poderão ser usados (Jander *et al.*, 2003).

No caso da utilização de modelos para prever o efeito de diferentes estratégias de controlo químico na evolução da resistência, Delye *et al.* (2013) chamam a atenção para a importância de conhecer o mecanismo de resistência e se a resistência é mono ou poligénica. Nos vários cenários, a resistência pode ser provocada por mutação génica, ou seja, alteração da sequência nucleotídica, nomeadamente pela substituição, inserção e/ou deleção de nucleótidos no local codificador do sítio ativo das enzimas (insensibilidade da enzima-alvo), por alteração da resistência metabólica, limitação da translocação, sobre-expressão ou amplificação génica, sem mutação, ou pela presença de resistências múltiplas.

As misturas de herbicidas têm maior probabilidade de atrasar a evolução em infestantes com resistência múltipla por alteração dos locais de ação relativamente à alternância de herbicidas. Para tal, os herbicidas deverão ter eficácias semelhantes na infestante alvo, pois caso contrário é provável que a resistência se desenvolva ao herbicida que exerce maior seleção (Délye *et al.*, 2013). Estratégias que envolvam alternância ou mistura de herbicidas serão mais eficazes a prevenir a evolução da resistência em espécies com movimento do pólen e dispersão de sementes limitados.

Entre estas, as misturas apresentam maior eficácia, ou seja, retardam mais o desenvolvimento da resistência, relativamente à alternância de herbicidas (Diggle *et al.*, 2003).

Um estudo sobre a evolução de resistência aos herbicidas utilizando *Chlamydomonas reinhardtii* como organismo modelo sugere que este fenómeno pode ser menos dispendioso e mais eficaz quando atribuído a alterações genéticas subtis para diversas vias, relativamente às alterações significativas em poucas vias (Vogwill *et al.*, 2012). Portanto, é espectável que no futuro a resistência predominante nas infestantes dos campos agrícolas seja do tipo poligénica, ou seja, que resulte de pequenas mutações em diversos genes que, no seu conjunto, poderão levar a níveis de resistência significativos.

2.4. *Conyza canadensis* (L.) Cronquist (avoadinha)

2.4.1. Taxonomia e distribuição

O género *Conyza* Less. pertence à família *Asteraceae* e inclui cerca de 50 espécies. Destas, *Conyza canadensis* (L.) Cronquist e *C. bonariensis* (L.) Cronquist são as que mais se destacam como infestantes das culturas e, em alguns locais, *C. sumatrensis* (L.) Cronquist (Kissmann e Groth, 1999). As espécies do género *Conyza* possuem elevada capacidade de adaptação e, portanto, ocorrem em diferentes condições edafoclimáticas. *C. canadensis* encontra-se bastante distribuída no mundo, ocorrendo principalmente em regiões de clima temperado do hemisfério norte ou de clima subtropical do hemisfério sul (Kissmann e Groth, 1999). Wurzell (1988) observou que *C. canadensis* é a menos exigente das três espécies e que esta se desenvolve e reproduz abundantemente em locais de temperatura mais baixa, embora se consiga desenvolver nos mesmos locais onde ocorrem as outras duas espécies. *Erigeron canadensis* L., *Erigeron pusillus* Nutt., *Leptilon canadense* (L.) Britton e Brown e *Marsea canadensis* (L.) V. M. Badillo são algumas sinonímias dos nomes científicos para *C. canadensis* (Lorenzi, 2000).

2.4.2. Biologia

Consoante as condições ambientais, a espécie *C. canadensis* pode-se comportar como uma planta de ciclo anual ou bianual (Regehr e Bazzaz, 1979) e reproduz-se apenas por sementes. Cada planta produz entre 135 a 200 mil sementes (Bhowmik e Bekech, 1993) muito leves (0,00004 a 0,6 mg), facto que tem sido considerado como uma das explicações para a sua rápida disseminação e dispersão (Holm *et al.*, 1997). A dispersão das sementes é também facilitada pela estrutura morfológica denominada “papilho”, que permanece presa às cipselas (frutos), que consiste numa

adaptação do cálice das flores, constituída por pêlos ou ganchos ou espinhos. Estas estruturas facilitam a dispersão pelo vento e podem aderir aos pêlos dos animais, transportando as sementes para grandes distâncias (Andersen, 1993). Apesar das sementes não apresentarem dormência, podem permanecer viáveis no solo por períodos relativamente longos; quando as condições de temperatura e humidade são favoráveis, podem germinar imediatamente após a dispersão (Wu *et al.*, 2007). Segundo Dauer *et al.* (2007), 99% das sementes de *C. canadensis* dispersas são encontradas num raio de 100 m da população-fonte, enquanto as restantes (1%) se podem dispersar a distâncias superiores a 500 m.

C. canadensis é autocompatível, sendo o pólen libertado antes dos capítulos se abrirem completamente, sugerindo autopolinização, embora os insetos visitem as flores abertas. Contudo, a autopolinização não parece ser a forma mais frequente de reprodução nesta espécie, o que pode explicar a reduzida diferenciação entre *C. canadensis* e *C. bonariensis*, bem como a hibridação entre espécies de *C. canadensis* e outras espécies do género *Conyza*, principalmente *C. sumatrensis* e *C. bonariensis* (Smisek, 1995). Contudo Zelaya *et al.* (2007) duvida desta possibilidade considerando a diferente ploidia das espécies. *C. canadensis* e *C. sumatrensis* são diploides ($2n = 18$) enquanto *C. bonariensis* é poliploide ($2n = 36$).

A adaptabilidade de *C. canadensis* deve-se não só à sua elevada capacidade de produção e dispersão de sementes, juntamente com a faculdade de autopolinização, mas também à sua elevada variabilidade genética. Um estudo realizado por Mangolin *et al.* (2012) evidenciou, através da análise do polimorfismo de isoenzimas, uma elevada variabilidade genética dentro de populações de *C. canadensis* e *C. bonariensis* e uma reduzida diferenciação genética entre as duas espécies. A reduzida diferenciação e a elevada variabilidade genética pode ser consequência da troca de alelos entre as duas espécies.

Os diversos aspetos comuns entre *C. canadensis* e *C. bonariensis* fazem com que seja frequente a confusão na diferenciação entre elas (Fig. 1). A principal diferença entre ambas é a inserção das inflorescências e a margem das folhas (Kissmann e Groth, 1999); porém, outras características morfológicas podem ser úteis na diferenciação das duas espécies (Quadro 1).



Figura 1. Aspectos morfológicos das folhas e caules (indumento), inflorescência e capítulos de *Conyza canadensis* (L.) Cronq. (Fotos de Ana Monteiro).

Quadro 1. Sinonímia, nomes vulgares e caracterização morfológica de *Conyza canadensis* e *Conyza bonariensis* (Adaptado de Lazaroto *et al.*, 2008).

Característica	<i>C. canadensis</i>	<i>C. bonariensis</i>
Sinónimos	<i>Erigeron Canadensis</i> L., <i>E. pusillus</i> Nutt., <i>Leptilon canadense</i> (L.) Britton, <i>Marsea Canadensis</i> (L.) V. M. Badillo	<i>Erigeron bonariensis</i> L., <i>Erigeron linifolius</i> Willd., <i>Leptilon bonariense</i> (L.) Small, <i>Leptilon linifolium</i> (Willd.) Small, <i>Erigeron crispus</i> Pourr.
Nomes comuns	aboadeira, avoadinha, avoadinha-peluda, erva pau, raposa	aboadeira, avoadinha
Ciclo	Anual ou bienal	Anual
Origem	América do Norte	América do Sul
Tipo	Herbáceo	Herbáceo
Porte	Ereto	Ereto
Altura	Até 2,5 m	Até 2,0 m
Raiz	Pivotante	Pivotante
Caule	Cilíndrico, glabro	Cilíndrico
Ramificações	Intensa, apenas na parte superior	Na base, em baixa densidade, e no ápice, em alta densidade
Ramos	Não ultrapassam o topo do caule	Elevados, ultrapassando o topo do caule
Folhas	Isoladas, simples, sésseis, de formato linear-lanceolado	Simples, sésseis, alternas, oblanceoladas ou lanceoladas
Tamanho das folhas	15,0 x 1,5 cm	6,0-12,0 x 1,5-2,5 cm
Margens das folhas	Finamente denteadas	Não-denteadas
Inflorescência	Panícula ereta, muito ramificada, na parte superior da planta	Panículas formadas por ramos ascendentes na parte superior do caule e ramos
Cipselas	Subcilíndricas, com ápice truncado, pouco mais largas acima do meio, atenuados para a base, 1,3 x 0,3mm	Obcónico-comprimidas, retas ou levemente curvadas longitudinalmente, 1,0-1,3 x 0,3-0,4 mm
Papus	10-25 pêlos, com 3-4 mm de comprimento	10-25 pêlos, até 3 vezes o comprimento do aquênio

As folhas de *C. canadensis* são alternas, simples, sésseis, de formato linear-lanceolado, com tamanho médio de 15,0 x 1,5 cm, finamente denteadas (Kissmann e Groth, 1999) e anfiestomáticas, ou seja, apresentam estomas nas duas epidermes; os estomas são anomocíticos, isto é, estão envolvidos por um número variável de células anexas que não diferem das outras células epidérmicas, e ambas as espécies possuem tricomas tectores unicelulares e pluricelulares, assim como ausência de cristais epicuticulares (Inácio e Monquero, 2013). Na fase de plântula, tanto o hipocótilo como o epicótilo são praticamente impercetíveis. Desta forma, após a germinação das sementes e a emergência das plântulas, estas formam uma roseta para posteriormente desenvolverem o caule (Vidal *et al.*, 2007). As flores centrais são hermafroditas e em grande número; os capítulos florais são amarelados e, na maturação, formam globos com menos de 1 cm de diâmetro; na parte superior do caule, forma-se uma grande panícula, sem que os ramos excedam o topo. A planta adulta é ereta, podendo atingir até 3 m de altura (Kissmann e Groth, 1999).

2.4.3. Germinação

As sementes de *Conyza* são fotoblásticas positivas e, portanto, necessitam de estímulo luminoso para sua germinação (Vidal *et al.*, 2007). Nandula *et al.* (2006) não verificaram emergência a partir de sementes enterradas a profundidade maior do que 0,5 cm, enquanto Tremmel e Peterson (1983) relataram a diminuição da emergência em 90% a partir de sementes enterradas 1 cm abaixo da superfície do solo, comparativamente àquelas posicionadas à superfície.

Segundo Nandula *et al.* (2006), flutuações de temperatura num período de 24 h podem aumentar a germinação de *C. canadensis*, caso variem entre 20 e 25 °C; porém, estas não germinam quando a temperatura máxima e a mínima são inferiores a 12 e 6 °C, respetivamente. Ao avaliar potenciais de água no intervalo de -0,80 a 0 MPa, estes autores observaram que os maiores índices de germinação de sementes ocorrem para os maiores potenciais (entre -0,10 e 0 MPa), enquanto para potenciais menores (entre -0,80 e -0,20 MPa) verificaram uma redução significativa da germinação: a -0,40 MPa houve uma redução de 50% da germinação e a -0,60 MPa não ocorreu germinação.

Estudos realizados em laboratório (Nandula *et al.*, 2006) mostraram a influência do pH na germinação das sementes de *C. canadensis*, a qual variou entre 29 e 36% em soluções com pH a variar entre 6 e 10 e foi reduzida para 19% para pH entre 4 e 5. Estes estudos sugerem que a germinação é favorecida em solos pouco ácidos e alcalinos, relativamente aos solos mais ácidos. Solos mais argilosos também tendem a favorecer a germinação (Yamashita, 2010). A presença de sais interfere negativamente na germinação devido ao stresse hídrico provocado por estes (Yamashita e Guimarães, 2010).

2.5. Resistência a herbicidas

Os primeiros casos de resistência em *C. canadensis* foram registados em 1980, no Japão, aos herbicidas paraquato e diquato, os quais são inibidores da fotossíntese, nomeadamente do fotossistema I. Na década de 80 também foram registados, na Europa, os primeiros casos de resistência a herbicidas inibidores da fotossíntese, neste caso do fotossistema II. Nos anos 90, na Polónia, começaram a surgir biótipos resistentes a herbicidas inibidores da aceto-lactato sintase (ALS). Atualmente existem dezenas de relatos de biótipos que apresentam resistência cruzada aos inibidores dos fotossistemas I e II, da ALS e aos derivados da glicina, sendo esta a espécie do género *Conyza* com maior número de casos. Existem também casos de resistência múltipla envolvendo estes mecanismos (Heap, 2011).

No caso da resistência ao glifosato em *C. canadensis*, o primeiro relato ocorreu em 2000 no estado de Delaware, nos Estados Unidos, onde foram precisos apenas três anos de uso contínuo do glifosato como única alternativa de controlo em pós-emergência em culturas resistentes ao herbicida para originar as primeiras falhas de controlo da infestante devido à resistência (Vangessel, 2001). Em 2001, foi confirmada a resistência em biótipos nos estados de Kentucky, Tennessee e Mississippi (Koger *et al.*, 2004). Estes biótipos rapidamente se disseminaram em grande parte das regiões produtoras, encontrando-se atualmente em pelo menos 18 estados norte-americanos. Atualmente estão também descritos biótipos de *C. canadensis* RG no Brasil, Canadá, China, República Checa, Grécia, Itália, Polónia, Portugal e Espanha (Heap, 2014).

Estudos sugerem que a genética da resistência ao glifosato em *C. canadensis* é governada por um gene de cópia única, com um alelo de resistência semidominante (alelo R), localizado no genoma nuclear (Zelaya *et al.*, 2004; Shaner, 2009).

2.6. Meios de controlo

Tal como para as infestantes em geral, as práticas culturais podem contribuir significativamente para o controlo de *C. canadensis*. Bianchi *et al.* (2008) compararam a infestação de espécies do género *Conyza* em duas áreas diferentes, uma onde se cultivou o trigo como cultura de inverno e outra que permaneceu em pousio durante o mesmo período. Os resultados obtidos evidenciaram que a utilização de uma cultura com maior capacidade de cobertura do solo e com distribuição mais uniforme da palhada contribui para o controlo de *Conyza*. Neste caso, a intensidade média de infestação foi de 2,2 plantas/m², enquanto na área que permaneceu em pousio foi de 26,7 plantas/m². Além do menor número, as plantas que tiveram de competir com a cultura

apresentaram menor estatura após a colheita da campanha de inverno, o que facilitou o controlo químico.

Outra estratégia importante no controlo de biótipos de *Conyza* RG é a integração entre os meios de controlo cultural e os meios de controlo químico. Gazziero *et al.* (2010), no Brasil, avaliaram os efeitos da mesma aplicação de herbicida (AH) (glifosato + saflufenacil - 720 + 27 g e.a./ha) em duas áreas diferentes, uma cultivada com aveia no inverno e outra com milho cultivado em sequeiro (milho safrinha). Esta aplicação levou a um controlo de 93,3% na área cultivada com aveia e de 79,5% na área cultivada com milho, 81 dias após a aplicação (DAA). Isto deveu-se ao facto de as duas culturas terem diferentes capacidades de interferir com as plantas de *Conyza*.

Yamauti *et al.* (2010) avaliaram o potencial de herbicidas isolados ou em mistura no controlo de biótipos de *Conyza* spp. resistentes a herbicidas, bem como o efeito da aplicação sequencial. Os melhores resultados foram observados 45 DAA, com eficiência de 87% para as aplicações de glifosato + paraquato (bromacil + diurão) e paraquato isolado, sendo reduzido para 35%, 70% e 37%, respetivamente, após aplicação sequencial do glifosato. Na área onde o estudo foi realizado, o biótipo R ainda se encontrava em processo de colonização, sendo possível encontrar tanto biótipos resistentes como suscetíveis ao glifosato. Daqui resulta que a rotação de herbicidas com diferentes MDA deve ser feita assim que possível, para evitar a formação de um banco de sementes de plantas resistentes (Vidal *et al.*, 2006).

2.7. Glifosato

2.7.1. Propriedades químicas

A substância ativa designada por glifosato foi sintetizada pela primeira vez em 1950 por Henri Martin (Cilag Company, Suíça) e, em 1970, John Franz (Monsanto Company, EUA) descobriu as suas propriedades herbicidas (Parrot *et al.*, 1995). O seu nome químico é N-(fosfonometil)glicina de acordo com a nomenclatura da International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) e a sua fórmula empírica é $C_3H_8NO_5P$. Trata-se de um ácido orgânico fraco que consiste em metade glicina e metade fosfonometil. Normalmente é formulado como um sal do ácido desprotonado e um catião. A pureza do glifosato encontra-se normalmente acima dos 90%. É um pó branco cristalino, inodoro, com uma densidade específica de 1,704, baixa pressão de vapor e alta solubilidade em água. É anfotérico e, dependendo do pH, pode existir como espécies iónicas diferentes (Mensink e Janssen, 1994).

O glifosato é um herbicida de pós-emergência, pertencente à família química das glicinas substituídas, classificado como não-seletivo e de ação sistêmica. É um herbicida total pois apresenta largo espectro de ação, possibilitando o controle de infestantes anuais ou perenes, monocotiledóneas ou dicotiledóneas, tanto em áreas agrícolas como em áreas florestais. Pode também ser usado em zonas não cultivadas, como sistemas de água, incluindo irrigação e águas temporariamente drenadas, parques, bermas de estradas, e jardins (Galli e Montezuma, 2005; Mensink e Janssen, 1994). A nível nacional, é o herbicida mais utilizado, sendo por isso considerado um herbicida de elevado risco de resistência (Mendes *et al.*, 2012).

Em 1996, foi identificado o primeiro caso de resistência ao glifosato em *L. rigidum*, na Austrália, seguindo-se um aumento no número de casos, sobretudo em culturas transgênicas e nos Estados Unidos (Powles e Yu, 2010) (Fig. 2 e 3).

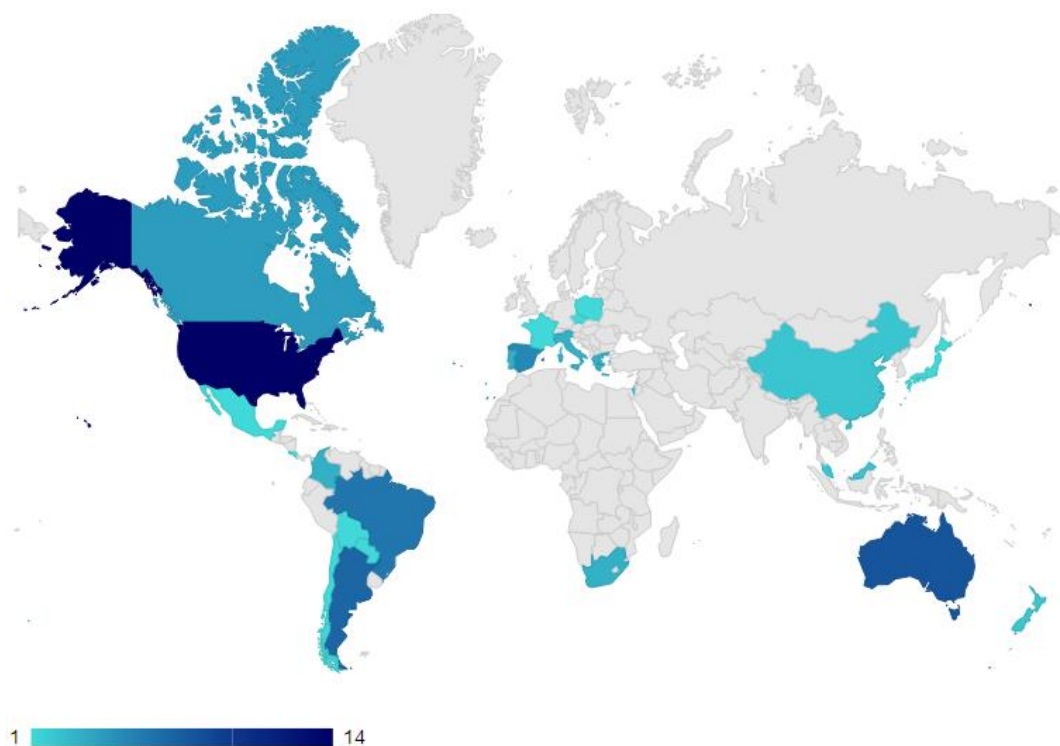


Figura 2. Mapa mundial dos casos de resistência adquirida ao glifosato (Heap, 2014)



Figura 3. Casos de resistência ao glifosato por espécies (Heap, 2014).

2.7.2. Modo de ação e comportamento nas plantas

O glifosato é um herbicida sistêmico de absorção foliar. A absorção da substância ativa ocorre principalmente nos órgãos das plantas com clorofila (folhas e tecidos verdes) e a translocação ocorre preferencialmente pelo floema, para os tecidos meristemáticos (Galli e Montezuma, 2005).

Não se sabe exatamente como o glifosato se move no floema. O glifosato tem de entrar no lúmen do floema, presumivelmente através do simplasma celular, podendo ser difundido em direção às células do mesófilo ou ser transportado ativamente para o mesófilo ou para as células companheiras através de um transportador de fosfato. Uma vez presente no floema, ele é retido devido às suas propriedades hidrofílicas e é transportado para os tecidos. Ao nível celular, o mecanismo de absorção do glifosato também não é bem compreendido. Aparentemente existem pelo menos dois mecanismos de absorção: um sistema ativo, que opera a baixas concentrações de herbicida, e um sistema passivo de fluxo de massa (Shaner, 2009).

Nas plantas, a absorção e a liberação de substâncias é um processo seletivo. Porém, como o glifosato é um derivado da glicina, que é um aminoácido essencial presente nas plantas, não é reconhecido como um agente agressor e, portanto, normalmente é pouco exsudado pelas raízes (Coupland e Peabody, 1981).

O glifosato atua como um potente inibidor da atividade da 5-enolpiruvilshiquimato-3-fosfato sintase (EPSPS, EC 2.5.1.19). Esta enzima é sintetizada no núcleo, atua no cloroplasto e possui um

péptido de transporte que se liberta quando atinge cloroplasto (Sammons e Gaines, 2014). A EPSPS catalisa uma das reações da via do shiquimato, nomeadamente a formação de 5-enolpiruvilshiquimato-3-fosfato (EPSP) e fosfato inorgânico a partir de fosfoenolpiruvato (PEP) e shiquimato-3-fosfato (S3P). Assim, o glifosato inibe a síntese dos aminoácidos aromáticos fenilalanina, tirosina e triptofano, os quais são necessários para a síntese de proteínas (Jablonkai, 2011). Este MDA é único no conjunto de todos os herbicidas conhecidos e é exclusivo de plantas e microrganismos. Os animais não possuem a via bioquímica dos aminoácidos aromáticos, nem a enzima EPSPS, o que explica a seletividade do glifosato para mamíferos e invertebrados (Székács e Darvas, 2012).

As sete reações enzimáticas da via do shiquimato associam-se ao metabolismo central do carbono e à rede de aminoácidos, através da conversão do PEP e do D-eritrose 4-fosfato (E4P) – intermediários nas vias da glicólise e do fosfato de pentose, respetivamente – a corismato, o precursor universal para todos os aminoácidos e numerosos metabolitos derivados deles (Duke e Powles, 2008) (Fig. 4).

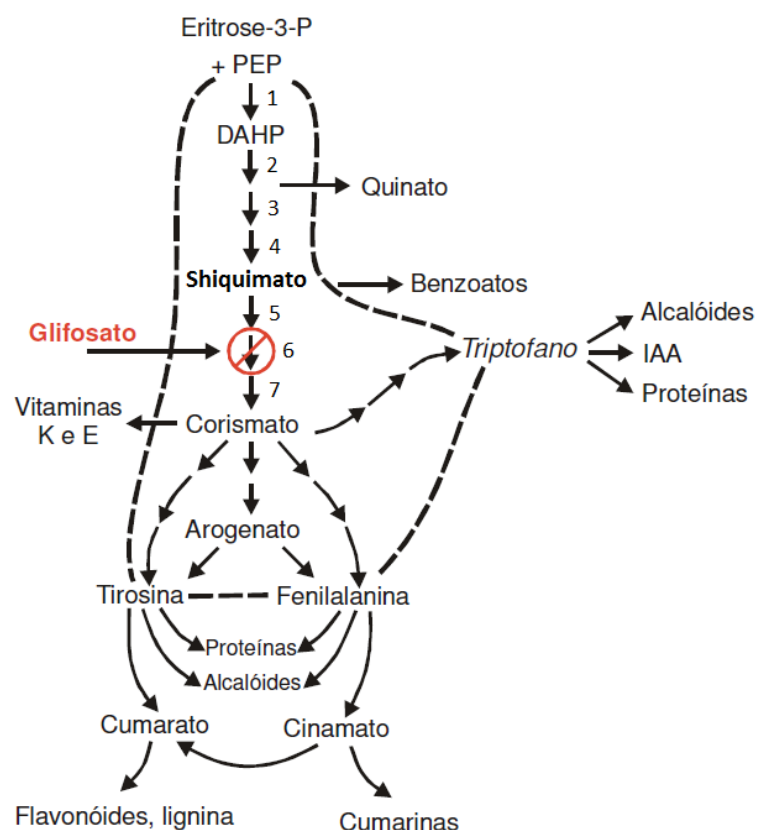


Figura 4. A via do shiquimato, a sua relação com outras vias metabólicas e o sítio da sua inibição pelo glifosato. Os números representam as enzimas que catalisam as reações da via do shiquimato: 1 corresponde à 3-desoxi-D-arabinoheptulosonato-7-fosfato sintase, 2 à 3-desidroquinato sintase, 3 à desidroquinato desidratase, 4 à shiquimato desidrogenase, 5 à shiquimato quinase, 6 à 5-enolpiruvilshiquimato-3-fosfato sintase, que é inibida pelo glifosato, e 7 à corismato sintase (Adaptado de Yamada e Castro, 2004).

Nesta via, uma molécula de E4P e duas de PEP são usadas para a biossíntese do corismato. O triptofano é produzido a partir do corismato através da via do triptofano, enquanto a fenilalanina e a tirosina são produzidas nas vias do arogenato ou do fenilpiruvato/4-hidroxifenilpiruvato. As enzimas desidroquinato desidratase (DHD) e a shiquimato desidrogenase (SDH) formam uma enzima DHD-SDH bifuncional em plantas, enquanto a aminodesoxicorismato sintase α (As α) e a aminodesoxicorismato sintase β (As β), bem como a triptofano sintase α (TS α) e a triptofano sintase β (TS β), formam os complexos enzimáticos não covalentes AS e TS, respetivamente (Maeda *et al.*, 2012).

A enzima EPSPS catalisa o penúltimo passo da via do shiquimato, a formação do EPSP, transferindo a fração do enolpiruvil do PEP para a posição 5-hidroxil do shiquimato 3-fosfato. Esta unidade C3 enolpiruvil origina a cadeia lateral da fenilalanina e da tirosina e é removida durante a biossíntese de triptofano. Esta enzima é inibida competitivamente pelo glifosato ao nível do segundo substrato, o PEP, ocupando o sítio de ligação do PEP ao complexo enzimático shiquimato 3-fosfato. As EPSPS de diferentes organismos têm sido agrupados em duas classes baseadas na sensibilidade ao glifosato: todas as plantas e a maioria das bactérias, incluindo a *Escherichia coli*, possuem enzimas EPSPS de classe I suscetíveis ao glifosato, enquanto algumas bactérias, tais como a estirpe CP4 de *Agrobacterium sp.*, possuem enzimas EPSPS de classe II que são menos suscetíveis ao glifosato e, portanto, têm sido usadas para gerar culturas geneticamente modificadas tolerantes ao glifosato (Maeda *et al.*, 2012).

2.7.3. Comportamento no solo e na água

A principal via de degradação do glifosato são os microrganismos de solo e água. A degradação ocorre sob condições aeróbias e anaeróbias, sendo realizada por uma grande variedade de microrganismos que usam o glifosato como fonte de energia e fósforo, por meio de duas vias metabólicas (Dick e Quinn, 1995). A via principal é a via do ácido aminometilfosfónico (AMPA), na qual ocorre a quebra da ligação carboximetil C-N do glifosato, por ação da enzima glifosato-oxidorreductase (GOX), obtendo-se AMPA e glioxilato. A via secundária é a via da glicina, que consiste primeiramente na libertação do grupo fosfato por quebra da ligação C-P, produzindo-se sarcosina, que posteriormente é convertida em glicina pela sarcosina-oxidase-desidrogenase por quebra da ligação fosfonometil C-N. (Feng *et al.*, 2010). Estes processos são rápidos, sendo a meia-vida média do glifosato de 32 dias (Giesy *et al.*, 2000).

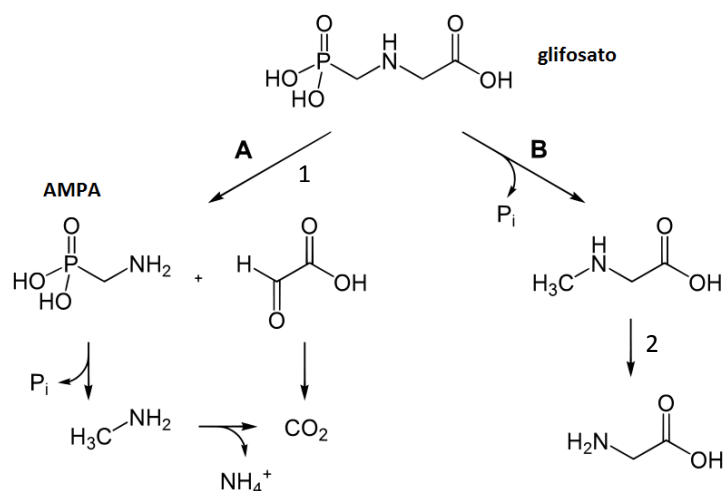


Figura 5. Vias de degradação do glifosato. A representa a degradação no solo, plantas e animais; B representa a degradação em culturas microbianas (adaptado de Giesy *et al.*, 2000). Os números representam as enzimas que catalisam as reações das duas vias: 1 corresponde à glifosato-oxidoreductase (GOX) e 2 à sarcosina-oxidase-desidrogenase.

Os genes que codificam as enzimas envolvidas na degradação do glifosato podem ser utilizados para produzir culturas RG (Yu *et al.*, 2009). O GOX proveniente de *Ochrobactrum* spp. é usado em colza (*Brassica napus* L. var. *oleífera* (Moench) DC.) RG. Porém, devido ao facto do AMPA ser moderadamente fitotóxico, por vezes, a presença deste gene não produz a resistência desejada. Assim, é espectável que no futuro se desenvolva uma nova geração de culturas RG contendo o gene de uma glifosato N-acetiltransferase bacteriana alterada (Duke, 2011).

Sendo um composto orgânico dipolar, o glifosato apresenta rápida e elevada taxa de adsorção aos óxidos e hidróxidos de ferro e alumínio e à matéria orgânica do solo, o que elimina praticamente o risco de absorção radicular pelas culturas. A adsorção do glifosato e do AMPA é um processo irreversível (Prata *et al.*, 2000), o que o coloca na categoria de resíduo-ligado. O resíduo-ligado é a fração do defensivo que não retorna à solução do solo, tornando-se indisponível para as plantas (Galli e Montezuma, 2005). Certos fatores em condições de campo podem acelerar a inativação do glifosato, tais como i) maior atividade microbiana, a qual aumenta a degradação, ii) maiores concentrações de catiões metálicos, sobretudo Ca^{2+} proveniente da calagem e das fertilizações, os quais formam complexos com o glifosato, e iii) maiores oscilações da humidade nas camadas superficiais e da temperatura do solo (Prata, 2002).

Devido ao facto do glifosato aderir fortemente ao solo, é pouco provável que contamine as águas superficiais por escoamento superficial ou as águas ou subterrâneas por lixiviação. A maior parte do glifosato encontrado na água é provavelmente resultante de escoamento superficial, do arrastamento durante a pulverização e/ou do excesso de pulverização intencional ou não. Na maioria

dos casos, é rapidamente dissipado dos lençóis de água através da adsorção a substâncias orgânicas e argilas inorgânicas e da degradação (Feng *et al.*, 1990). Os resíduos adsorvidos nas partículas suspensas são precipitados para os sedimentos que estão no fundo, onde podem persistir até serem degradados por microrganismos (Goldsborough e Brown, 1993).

De acordo com a diretiva UE das Substâncias Perigosas 1999/45/CE, o produto comercial Roundup® (Bayer®) não é classificado como perigoso. A respectiva ficha de dados de segurança indica a sua baixa toxicidade para os animais, incluindo o homem, e a sua elevada toxicidade para algas e plantas aquáticas, não se prevendo efeitos adversos significativos caso seja evitada a nuvem de pulverização e sejam cumpridas as restantes recomendações descritas no rótulo do produto (Monsanto, 2010).

2.7.4. Riscos para o homem e outros animais

O metabolismo do glifosato nos animais é mínimo. Machos e fêmeas de ratinhos *Sprague-Dawley* tratados com uma simples dose oral de ^{14}C -glifosato rapidamente eliminaram mais de 97% da dose administrada. Cerca de 30-36% da dose foi absorvida e eliminada na urina, e a restante dose radioativa foi eliminada nas fezes. Com exceção do glifosato não metabolizado, os únicos metabolitos detetados foram o AMPA e o $^{14}\text{CO}_2$; contudo, eles representaram cerca de 0,2-0,3% do administrado radioativamente. A dosagem repetida não alterou significativamente o perfil de metabolismo, distribuição, ou excreção do glifosato nos ratinhos. Estudos realizados em galinhas poedeiras e em cabras lactantes evidenciaram um percurso metabólico similar. Macacos *Rhesus* tratados intravenosamente com ^{14}C -glifosato rapidamente excretaram a dose administrada como composto original, 80% na urina em 24 horas e 94-99% em 7 dias (Roberts, 1998).

2.8. Mecanismos de resistência

2.8.1. Principais mecanismos de resistência em plantas infestantes

A resistência a herbicidas pode ocorrer por três mecanismos principais: i) alteração da enzima no local de ação do herbicida, ii) metabolização do herbicida e iii) redução da concentração do herbicida no local de ação (Christoffoleti, 2004). Existe ainda um quarto mecanismo, que pode ser chamado de “prevenção”, que consiste na capacidade de manipular a toxicidade do agente herbicida. Um exemplo deste mecanismo é a sobre-expressão da superóxido dismutase para neutralização do paraquato (Sammons e Gaines, 2014) (Quadro 2).

Quadro 2. Síntese dos mecanismos de resistência ao glifosato identificados nas principais infestantes resistentes ao glifosato (adaptado de Sammons e Gaines, 2014).

Táxone	Fora do local de ação		No local de ação - EPSPS					
	Redução da translocação	Redução da absorção	Mutação no gene <i>epsps</i>				Superprodução	
			Pro 106 Ser	Pro 106 Thr	Pro 106 Ala	Pro 106 Leu	Sobre-expressão	Repl- cação
<i>Amaranthus palmeri</i> S. Wats.		x						x
<i>Amaranthus spinosus</i> L.								x
<i>Amaranthus tuberculatus</i> (Moq.) Sauer (= <i>A. rudis</i>)	x	x	x					x
<i>Ambrosia artemisiifolia</i> L.	x							
<i>Ambrosia trifida</i> L.	x							
<i>Conyza bonariensis</i> (L.) Cronq.	x						x	
<i>Conyza canadensis</i> (L.) Cronq.	x		x				x	
<i>Digitaria insularis</i> (L.) Mez ex Ekman	x	x		x				
<i>Echinochloa colona</i> (L.) Link	x		x					
<i>Eleusine indica</i> (L.) Gaertn.			x	x	x			
<i>Kochia scoparia</i> (L.) Schrad.								x
<i>Lolium rigidum</i> Gaudin	x		x	x	x	x		
<i>Lolium multiflorum</i> Lam.	x		x					x
<i>Sorghum halepense</i> (L.) Pers.	x	x						

O herbicida é eficaz quando atinge o local de ação ou sítio alvo na planta onde exerce a sua ação fitotóxica. Este local específico pode sofrer alterações e o herbicida, sem se ter alterado, torna-se incapaz de exercer a sua ação. Alguns exemplos de grupos de herbicidas que apresentam este mecanismo de ação são: grupo A (inibidores da acetil-CoA carboxilase, ACCase), grupo B (inibidores da aceto lactato sintase), Grupo C (inibidores de Fotossistema II) e Grupo K (inibidores da divisão celular) (Vidal e Merotto Jr., 2001). Até agora, a maioria dos casos de resistência a herbicidas detetados envolveram alterações no sítio alvo do herbicida (Hager *et al.*, 2000).

A metabolização do herbicida pode ocorrer antes deste atingir o sítio alvo em quantidades passíveis de causarem danos irreversíveis na planta. As enzimas envolvidas neste processo são as citocromo P450 monoxigenases (cit-P450) e a glutationa-S-transferase (GST). Alguns exemplos de grupos de herbicidas para os quais as plantas apresentam a metabolização como mecanismo de resistência são: grupo A, grupo B, grupo C, grupo D (inibidores de Fotossistema I), grupo K, grupo O

(auxinas sintéticas) e grupo G (inibidores de EPSPS) (Vidal e Merotto Jr., 2001). Geralmente a capacidade de metabolizar um herbicida é regulada por diversos genes, o que diminui a probabilidade de desenvolvimento deste mecanismo de resistência (Kissmann, 2003). No caso do glifosato, a metabolização é bastante reduzida, sendo este pouco degradado e por conseguinte bastante estável nas plantas (Duke, 2011).

Alterações na composição da cutícula ou na morfologia das folhas das infestantes podem resultar numa menor exposição aos herbicidas e, por conseguinte, numa menor retenção. Este mecanismo tem sido pouco estudado pelo facto de geralmente as aplicações de ^{14}C -glifosato serem feitas manualmente, o que implica uma retenção total, enquanto a aplicação das doses de campo com pulverizador leva uma taxa de retenção de 40 a 60% (Feng *et al.*, 2004). A redução da concentração do herbicida no local de ação também pode ocorrer através da compartimentação, ou seja, do sequestro do herbicida em determinados compartimentos celulares, como o vacúolo, por exemplo. Alguns grupos de herbicidas suscetíveis a este mecanismo são o grupo A e o Grupo D (Vidal e Merotto Jr., 2001).

2.8.2. Mecanismos de resistência ao glifosato em *C. canadensis*

Os mecanismos que podem conferir resistência a herbicidas podem dividir-se em dois grupos: i) resistência por alteração do local de ação e ii) resistência fora do local de ação (Quadro 2). A resistência por alteração do local de ação está associada à insensibilidade da enzima-alvo, que conduz à perda de afinidade para a molécula de herbicida. A resistência no sítio alvo inclui também a superprodução da enzima alvo, por sobre-expressão ou replicação génica, aumentando a estabilidade da enzima ao agente inibidor. A resistência fora do local de ação está associada à exclusão da molécula de herbicida do local de ação, via absorção ou translocação diferenciais, sequestro ou aumento do metabolismo de desintoxicação (Perez-Jones e Mallory-Smith, 2010). Particularmente para o glifosato podem coexistir na mesma planta vários mecanismos de resistência e não apenas um, como acontece na maioria dos herbicidas, sendo que os níveis de resistência variam consoante o tipo de mecanismo (Perez-Jones e Mallory-Smith, 2010).

Insensibilidade da enzima EPSPS

Cada herbicida atinge um sítio específico na planta, normalmente uma enzima ou uma proteína, onde atua no sentido de interromper um dado processo ou função da planta. Se este sítio alvo estiver de alguma forma alterado, a molécula de herbicida poderá não ter a capacidade de exercer

eficientemente o seu efeito fitotóxico. A resistência ao glifosato também pode dar-se por este mecanismo. O primeiro caso identificado ocorreu num biótipo de *Eleusine indica* (Baerson *et al.*, 2002), devido à substituição de uma serina por uma prolina na posição 106 (Pro-106-Ser) na sequência de aminoácidos da enzima EPSPS – provocada por uma mutação pontual no nucleótido citosina, substituído por timina. Posteriormente, em populações de *E. indica* e de *Lolium* spp. foram observadas mutações génicas que conduziram a substituições por treonina e alanina no resíduo do aminoácido Pro-106 (Powles e Yu, 2010). Esta mutação foi identificada como sendo a principal causa dos níveis de resistência moderada em diversas espécies (Nol *et al.*, 2012; Sammons e Gaines, 2014).

Powles e Yu (2010) sugerem que é expectável que ocorram mais casos de desenvolvimento de resistência por sobre-expressão do que por mutação do gene que codifica a EPSPS, devido à dificuldade em obter enzimas RG que mantenham a funcionalidade enzimática.

Outra estratégia de sobrevivência é a emissão de novos ramos após a aplicação de glifosato, que representa uma possível fuga à inibição pelo herbicida (Dinelli *et al.*, 2006).

Limitação da translocação

A absorção do glifosato para o interior das células e organelos celulares é um processo ativo. Existem vários potenciais mecanismos através dos quais a absorção do glifosato pode ser reduzida: (1) Inibição da absorção através da modificação do transportador ativo, (2) inibição da absorção de glifosato no interior do cloroplasto através de um transportador que o bombeia para fora do cloroplasto, (3) presença de um transportador ativo que bombeia da célula para o apoplasto, e (4) presença de um transportador ativo que bombeia o glifosato para o interior do vacúolo (Shaner, 2009).

Um estudo realizado por Koger *et al.* (2005a) em *C. canadensis* de quatro diferentes regiões dos EUA sugere que, nesta espécie, os mecanismos absorção não estão envolvidos na resistência ao glifosato e que as diferentes sensibilidades ao glifosato poderão ser atribuídas a diferenças na translocação. Feng *et al.* (2004) também sugerem que a absorção diferencial resultante da aplicação do glifosato não contribui para a resistência em *C. canadensis*.

Estudos recentes sugerem que em biótipos R de *C. canadensis* ocorre um movimento preferencial do glifosato do citosol para o vacúolo, no qual transportadores *ATP-binding cassette* (ABC) poderão estar envolvidos (Ge *et al.*, 2010; Nol *et al.*, 2012). Os transportadores ABC constituem uma vasta família de transportadores dependentes de ATP que bombeiam aminoácidos, péptidos, proteínas, iões metálicos, vários lípidos, sais biliares, e diversos compostos hidrofóbicos, incluindo drogas, através das membranas e contra o gradiente de concentração (Lehninger *et al.*, 2005).

Num estudo sobre a expressão de dois genes, M10 e M11, que codificam para transportadores ABC de populações de *C. canadenses*, e cuja presença da mutação no resíduo Pro106 da EPSPS não tinha sido confirmada, Nol *et al.* (2012) observaram que os transcritos dos genes M10 e M11 eram, respectivamente, 16 e 23 vezes superiores nos dois biótipos R tratados com glifosato, relativamente às plantas R não tratadas. Contrariamente, a expressão dos mesmos genes no biótipo S não foi afetada pela aplicação do glifosato. Além disto, não houve variação significativa na transcrição do gene da EPSPS nos três biótipos estudados. Isto indica que o mecanismo de resistência dos biótipos estudados consistiu numa sobre-expressão génica dos genes M10 e M11 que levou a uma maior compartimentação do herbicida no vacúolo.

A redução da translocação do glifosato para os tecidos meristemáticos é o mecanismo de resistência ao glifosato mais comum em *C. canadensis* (Koger *et al.*, 2005, Nol *et al.*, 2012).

Superprodução da enzima EPSPS

A superprodução da enzima EPSPS corresponde à presença de uma maior quantidade de enzima EPSPS registada num biótipo R relativamente a um biótipo S. Existem dois fenómenos genéticos subjacentes a este: a sobre-expressão (transcrição repetida de um único gene, processo mediado pelo DNA) e a replicação ou amplificação génica (várias cópias do mesmo gene no genoma).

A redução da translocação não protege completamente os tecidos meristemáticos e uma fração do glifosato alcança os meristemas caulinares. Por este motivo, a sobre-expressão da EPSPS pode contribuir para sobrevivência dos biótipos R (Dinelli *et al.*, 2006). Dinelli *et al.* (2006) observaram que houve uma sobre-expressão do gene *epsps* nos biótipos R em relação aos S de *C. canadensis*, ou seja, os biótipos R apresentaram níveis de mRNA de EPSPS duas a três vezes superiores aos dos biótipos S, antes da aplicação de glifosato. Em *Amaranthus palmeri*, a sobre-expressão deste gene pode ser de 5 a 160 vezes (Gaines *et al.*, 2013). Dinelli *et al.* (2006) também observaram que a expressão da EPSPS não foi induzida pela aplicação de glifosato.

O mecanismo da superprodução da EPSPS é ainda desconhecido. Um mecanismo possível é a replicação génica (ou amplificação génica), definida como a replicação hereditária de um segmento de DNA, que resulta numa ou mais cópias adicionais de genes no genoma de um organismo (Innan e Kondrashov, 2010). O elevado tamanho da sequência, a associação com vários tipos de elementos genéticos e os padrões imprevisíveis de hereditariedade do número de cópias levantam a hipótese da replicação génica ser uma mutação adaptativa induzida através de um processo mediado por transposições e/ou através da recombinação desigual entre diferentes regiões genómicas que resultam na replicação do gene da EPSPS (Gaines *et al.*, 2013).

2.8.3. Fatores que afetam a resistência e consequências fisiológicas

A eficácia de um herbicida pode variar com a espécie, estado fenológico e com a temperatura a que está exposta, ou seja, depende do ambiente. Assim, uma mesma quantidade de herbicida aplicada a uma espécie pode ser eficaz sob determinadas condições e não produzir nenhum dano noutras.

Uma forma de medir os níveis de resistência é através do fator de resistência, dose que provoca o mesmo efeito na população R e na S de determinada espécie resistente a um herbicida. Este índice calcula-se com base no quociente do ED₅₀ obtido para cada uma das populações em ensaios de dose-resposta. O ED₅₀ é a dose de herbicida que provoca uma redução de 50 % na biomassa, na atividade enzimática ou na acumulação de shiquimato das plantas vivas, em relação à testemunha não tratada (Dinelli *et al.*, 2006). Todavia, em *Conyza* spp. a suscetibilidade ao glifosato, avaliada através dos valores de ED₅₀, pode variar dependendo de fatores como a espécie (Gonzalez-Torralva *et al.*, 2010), o estado fenológico (Shrestha *et al.*, 2007) e a temperatura (Ben-Ami *et al.*, 2007).

Através de ensaios de dose-resposta em condições de estufa, Gonzalez-Torralva *et al.* (2010) observaram que as três espécies em estudo do género *Conyza* exibiam elevada sensibilidade ao glifosato no estado de roseta, mas com diferentes valores de ED₅₀ entre as espécies. Os resultados mostraram que, relativamente à espécie *C. sumatrensis*, as espécies *C. bonariensis* e *C. canadensis* possuem uma tolerância ao glifosato 5,4 e 12 vezes superior, respetivamente, evidenciando a importância da identificação da espécie.

Em estudos de dose-resposta, Dinelli *et al.* (2006) observaram que o valor de ED₅₀ não apresenta diferenças significativas entre biótipos S e R no estado de duas folhas. Porém, no estado de roseta, observou-se um aumento generalizado dos valores de ED₅₀ de ambos os biótipos, sobretudo nos biótipos R, os quais foram 4,0 a 4,7 vezes superiores relativamente ao biótipo S, usado como padrão.

Nol *et al.* (2012) examinaram a resposta ao glifosato em plantas em diferentes estados fenológicos, nomeadamente no estado de 5 a 6 folhas (estado de plântula), no estado de 12 a 13 folhas com 5 a 8 cm de diâmetro (estado de roseta) e com 30 a 35 cm de altura (“bolting stage”). O estudo da influência do estado de desenvolvimento da planta na resistência ao glifosato foi feito através da comparação da percentagem de sobrevivência de biótipos de *C. canadensis* com diferentes níveis de resistência ao glifosato, aos quais tinha sido aplicada a dose recomendada de glifosato (0,548 kg a. e. ha⁻¹). Os resultados obtidos evidenciaram diferentes comportamentos dos biótipos. No biótipo S, a percentagem de sobrevivência foi proporcional ao estado de crescimento, tendo sido esta de 0, 20 e 40%, para os estados de plântula, roseta e “bolting stage”,

respetivamente. Nos três biótipos que exibiam algum grau de sensibilidade reduzida, o maior aumento da percentagem de sobrevivência ocorreu entre o estado de plântula e o estado de roseta, sendo que no “bolting stage” os três biótipos apresentaram 100% de sobrevivência. Quanto ao biótipo R, este apresentou 100% de sobrevivência nos três estados.

Em *Conyza* spp. a temperatura também pode influenciar a expressão da resistência. A baixas temperaturas (cerca de 12 °C) o glifosato permanece predominantemente no vacúolo. Contudo, este processo é reversível e o aumento da temperatura conduz ao aumento da translocação do glifosato para o vacúolo nas plantas que possuem este mecanismo de resistência. Ge *et al.* (2011) observaram este fenómeno em *C. canadensis* quer ao nível celular, através da espectroscopia de ressonância magnética nuclear com ^{31}P (^{31}P NMR, do inglês “Nuclear Magnetic Resonance”), quer ao nível macroscópico, através de ensaios de dose-resposta. Observaram também que a baixas temperaturas o glifosato foi menos tóxico para os biótipos S, mas mais tóxico para os biótipos R, relativamente àqueles que foram mantidos a temperaturas mais elevadas.

A adaptação a uma pressão seletiva (ex. herbicida) implica um custo de adaptabilidade quando resulta numa diminuição da capacidade de um organismo sobreviver e/ou reproduzir-se na ausência da pressão seletiva, e pode ser resultado de efeitos pleiotrópicos. O efeito pleiotrópico é o fenómeno em que um gene influencia múltiplos caracteres fenotípicos num organismo e ocorre quando a pressão seletiva sobre um dado carácter altera o valor médio do carácter correlacionado que tem um efeito negativo na adaptabilidade (Délye *et al.*, 2013). Exemplos de efeitos pleiotrópicos são o aumento da sensibilidade a outros herbicidas (resistência cruzada negativa) e a redução da produção de biomassa e sementes e da capacidade competitiva. Contudo, estes efeitos não são necessariamente determinantes, podendo mesmo ser benéficos, o que explica a persistência da resistência anos após o fim da pressão seletiva do herbicida (Chauvel *et al.*, 2009).

2.8.4. Métodos de determinação dos mecanismos de resistência

Segundo Shaner (2010), os métodos de deteção da resistência ao glifosato são i) ensaio de campo ou em estufa, ii) outros ensaios com planta inteira, iii) ensaios com sementes em placa de Petri, iv) ensaios baseados no metabolismo (metabolitos detetados por cromatografia líquida de alta eficiência ou espectrofotometria), v) ensaios *in vitro*, vi) absorção, translocação e metabolismo de ^{14}C -glifosato, vii) análise da sequência de DNA do gene *epsps* e viii) análise de expressão do gene *epsps* pela quantificação do seu mRNA.

2.8.4.1. Ensaios com planta inteira

Quando uma população é suspeita de ser RG, a caracterização inicial exige um ensaio dose-resposta detalhado de modo a confirmar, inequivocamente, a resistência (Heap, 2005). As plantas são submetidas a condições próximas da aplicação do herbicida em campo. As doses aplicadas dependem do nível de resistência, da sensibilidade da espécie e do número de plantas (VanGessel, 2001). Estes ensaios podem ser realizados em campo ou em estufa e ambos permitem determinar o fator de resistência a partir dos valores de ED_{50} de uma população R em relação a uma S. Contudo, note-se que as condições em estufa não mimetizam fielmente as condições de campo. Culpepper *et al.* (2006) observaram que as plantas de campo são cerca de duas vezes mais tolerantes ao glifosato do que as plantas de estufa. Estes ensaios proporcionam bons resultados; contudo, a sua obtenção exige bastante tempo e espaço (Beckie *et al.*, 2000) e não permitem determinar o mecanismo fisiológico e bioquímico responsável pela resistência.

Para contornar estes problemas, pode-se recorrer a outros ensaios com planta inteira. Um destes ensaios é o teste em estufa com plantas destacadas, desenvolvido por Boutsalis (2001), que consiste em obter plantas destacadas a partir de gramíneas aphiladas provenientes diretamente do campo ou de estufa, que são transplantados e deixados a recuperar antes do teste. Wakelin e Preston (2006) usaram este teste para confirmar a resistência em plantas de *L. rigidum* que possuíam mutação no gene codificador do EPSPS.

Yu *et al.* (2009), usando inibidores das enzimas cit-P450, nomeadamente o malatão e o amitrol, observaram que estes reforçam a ação do clorsulfurão e do diclofope, revertendo a resistência. Isto indica que a metabolização de herbicida mediada pelas enzimas cit-P450 poderá ser responsável pela resistência aos inibidores da ACCase e da ALS. Assim, inibidores das enzimas cit-P450 permitem detetar indiretamente a presença de resistência metabólica; contudo, isto não se aplica à resistência ao glifosato.

2.8.4.2 Ensaios com sementes em placa de Petri

Este tipo de ensaio biológico utiliza as fases mais iniciais do desenvolvimento das plantas - germinação de sementes e emergência dos primórdios foliares, caulinares e radiculares - como indicadores de resistência. Colocam-se sementes em placas de Petri (em agar ou papel de filtro) contendo diferentes concentrações de glifosato e mede-se o comprimento da radícula e do caulículo ou do coleóptilo, no caso das gramíneas, 4 a 8 dias após a aplicação. Um dos principais problemas deste método é a necessidade de um período de espera até se obter sementes não dormentes. Assim, estas devem ser colhidas no estado de maturação adequado e submetidas a um pré-

tratamento para quebra de dormência antes da realização do ensaio biológico. Este método tem sido usado principalmente para sementes grandes de gramíneas como em *Lolium* sp. (Perez e Kogan, 2003), mas foi recentemente adaptado para *C. bonariensis* (Santos, 2012) e *C. canadensis* (Cruz, 2013).

2.8.4.3 Ensaio com folhas destacadas ou discos de folhas

Os ensaios de folhas destacadas permitem detectar resistências através da observação dos sintomas de fitotoxicidade (área das manchas de clorose ou necrose) presentes nas folhas em contato com soluções de glifosato (Yuan *et al.*, 2002). Contudo, este método não é muito utilizado e serão necessários mais estudos para otimizar a eficácia do método (Shaner, 2010).

2.8.4.4. Ensaio baseado no metabolismo (via do shiquimato)

Entre os ensaios baseados no metabolismo, destaca-se a determinação da concentração de shiquimato em tecidos vegetais, por ser uma alternativa para detecção rápida de populações R. Esta acumulação resulta da inibição competitiva da EPSPS pelo glifosato (ver capítulo 2.7.2). Shaner *et al.* (2005) descreveram um ensaio biológico, no qual discos de folhas próximas do ápice caulinar são retirados e incubados com glifosato, sendo a quantidade de shiquimato acumulado nos tecidos medida por espectrofotometria.

Este bioensaio revelou ser um método de detecção de resistência ao glifosato particularmente eficaz nos casos em que o mecanismo de resistência consiste numa modificação na enzima EPSPS que a torna insensível à molécula de glifosato. Wakelin e Preston (2006) relataram o primeiro caso de resistência ao glifosato por este mecanismo em *Lolium rigidum*. Para tal, mediram a acumulação de shiquimato ao longo do tempo nas plantas tratadas com glifosato (225 g a.e. ha⁻¹) para determinar se a EPSPS estava a ser inibida *in vivo* pelo glifosato. Foram analisadas três populações diferentes: uma RG por translocação reduzida (RTR), uma S, e outra RG por um mecanismo desconhecido (RMD). Os níveis basais de shiquimato foram similares para as três espécies; porém, ao quarto DAA, os níveis de shiquimato aumentaram cerca de 10; 5 e 7,5 vezes nas populações S, RTR e DMD, respetivamente. Além disto, os níveis de shiquimato continuaram a aumentar nas populações S e RTR, ao passo que na RMD diminuíram. A sequenciação do cDNA sintetizado laboratorialmente a partir do mRNA extraído de plantas destas populações confirmou a substituição do aminoácido prolina, normalmente presente na posição 106 da proteína, por treonina, na população RMD.

O ensaio de determinação da concentração de shiquimato também pode ser usado para avaliar a regulação, normalmente a ativação dos genes M10 e M11 codificadores de transportadores ABC em biótipos de *C. canadensis* resistentes (Nol *et al.*, 2012). Contudo, este método não tem sido usado nos casos em que a resistência resulta da redução da translocação do herbicida para as regiões em crescimento das plantas (Shaner *et al.*, 2005).

Note-se que a sobre-expressão de uma EPSPS suscetível ao glifosato pode levar à redução dos níveis de shiquimato. Neste caso, o elevado número de cópias de uma enzima compensa a sua inibição (Dinelli *et al.*, 2006).

Segundo Ribeiro (2008) todos estes métodos são adequados para identificar os biótipos resistentes e, portanto, a escolha do método deve basear-se nos objetivos da caracterização.

Outros processos metabólicos, tais como a transpiração, a fotossíntese e a biossíntese de aminoácidos, entre outros, podem ser usados para detetar a resistência ao glifosato. Por exemplo, uma das respostas ao tratamento com glifosato é a redução da transpiração e consequente redução da fotossíntese, que pode ser medida algumas horas após o tratamento. O tratamento com glifosato causa albinismo e cloroses em tecidos metabolicamente ativos (Franz *et al.*, 1997) e a consequente redução do teor em clorofila pode ser usada como indicador da presença de resistência.

2.8.4.5 Ensaio *in vitro*

Os ensaios *in vitro* baseiam-se na medição da atividade enzimática da EPSPS e requerem um primeiro passo de purificação da proteína a partir de tecidos vegetais. Posteriormente são aplicados vários procedimentos para analisar a atividade da EPSPS (Shaner, 2010). O mais simples consiste em monitorizar a libertação do fosfato do PEP e do S3P usando o método verde malaquita (Lanzetta *et al.*, 1979). Padgett *et al.* (1988) descreve um ensaio que mede a formação de ^{14}C -EPSPS a partir de ^{14}C -PEP através da análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência ou HPLC (acrónimo do inglês “High-performance liquid chromatography”). A atividade da EPSPS pode ser medida no sentido inverso, acoplando o PEP libertado às reações da piruvato quinase e da lactato hidrogenase e monitorizando a oxidação do NADH (Boocock e Coggins, 1983). Estes ensaios apresentam a desvantagem de serem dispendiosos e, como são muito específicos, não conseguem confirmar a resistência se o mecanismo não for devido à insensibilidade da EPSPS, o que ocorre frequentemente.

2.8.4.6. Métodos baseados no DNA

Os métodos baseados no DNA, no âmbito específico dos estudos da resistência ao glifosato, permitiram a detecção de mutações por sequenciação do gene codificador da EPSPS (Shaner, 2010). O isolamento específico deste gene a partir do genoma de *C. canadensis* foi conseguido por amplificação seletiva do mesmo por recurso à Reação em Cadeia da Polimerase ou PCR (acrônimo do inglês “Polymerase Chain Reaction”). A PCR, inventada em 1983 por K. Mullis (Hill e Stewart, 1992) é atualmente uma tecnologia de uso regular nas mais diversas áreas de investigação, onde se pode destacar a detecção de mutações e a identificação precoce de biótipos. Resumidamente, a PCR consiste na amplificação, *in vitro* e sem o auxílio de organismos vivos como bactérias, de fragmentos específicos de DNA ou cDNA em diversas ordens de magnitude gerando milhões de cópias (“amplicon”). É de grande valor quando a quantidade inicial de DNA ou de cDNA/mRNA (previamente obtido a partir de mRNA por ação de uma transcriptase reversa) é muito baixa, embora mensurável, ou proveniente de indivíduos de baixa frequência nas populações. O fragmento de DNA ou cDNA/mRNA de cadeia dupla é usado como molde para a síntese de novas cadeias de DNA, à semelhança do processo de replicação de DNA que ocorre naturalmente nas células em mitose. Assim, ao extrato de DNA ou de cDNA/mRNA são adicionados: i) dois oligonucleótidos (“primers” ou iniciadores) de cadeia simples, cada um complementar a uma das extremidades no sentido 3’-5’ do fragmento a replicar e que se comportam como pontos de iniciação da atividade da DNA polimerase, ii) uma polimerase de DNA termorresistente como a *Taq* (naturalmente presente na bactéria das nascentes termais, *Thermus aquaticus*), iii) uma mistura dos quatro desoxirribonucleótidos trifosfatados que constituem as cadeias de DNA (dNTPs), iv) uma solução tampão especificamente preparada para permitir o ótimo funcionamento da polimerase de DNA utilizada e v) $MgCl_2$ que funciona como coadjuvante da polimerase (Coleman e Tsongalis, 2005). A técnica consiste na repetição de um ciclo térmico, composto por três passos: i) desnaturação do DNA que ocorre a 94-95 °C e que permite a quebra das ligações de hidrogénio que unem as duas cadeias da dupla hélice deixando disponíveis os desoxirribonucleótidos para se ligarem aos “primers”, ii) emparelhamento, hibridação ou “annealing” dos “primers”, por complementaridade com as sequências da cadeia de DNA molde, a uma temperatura variável e dependente da constituição nucleotídica, iii) extensão da nova sequência por polimerização dos dNTPs que se encontravam livres na mistura de reação, pela ação da DNA polimerase cuja ótima atividade se regista a 72 °C (Weaver, 2012). Estes ciclos térmicos repetem-se normalmente de 30 a 40 vezes.

Para determinar se a PCR gerou “amplicons” e, em particular, o “amplicon” desejado, os produtos da reação são sujeitos a uma eletroforese em gel de agarose. A eletroforese é um processo de migração de moléculas polares, através de uma malha porosa, quando sujeitas a uma diferença de

potencial elétrico, onde as moléculas de menor massa migram mais rapidamente. A molécula do DNA é negativa pelo que migra para o polo positivo. A agarose utilizada na preparação da malha porosa (o gel) é um polissacarídeo que permite regular a velocidade de migração das moléculas durante a passagem da corrente elétrica. A determinação do tamanho dos “amplicons” é feita por comparação com um padrão composto por fragmentos de DNA de comprimento conhecido (Brown, 2010).

A visualização dos “amplicons” após a eletroforese é feita pela adição de um corante fluorescente (ex. brometo de etídio ou, mais recentemente, GelRed) que se intercala entre as bases do DNA e o uso de radiação ultravioleta permitem a visualização das bandas de ácido nucleico ou de proteína (Brown, 2010).

Os “amplicons” de interesse, produzidos a partir de DNA ou de cDNA, após purificação (remoção dos reagentes sobrantes da PCR) e separação de todos os restantes “amplicons” podem ser sequenciados (Weaver, 2012).

Este método é utilizado para confirmar a insensibilidade da enzima ao herbicida em estudo (exemplo, EPSPS e glifosato) por mutação no gene que a codifica. Até hoje, em espécies de plantas infestantes só foram detetadas mutações no resíduo prolina com substituição por serina, treonina, alanina ou leucina (Sammons e Gaines, 2014). Todavia Powles e Yu (2010) chamam a atenção para outras mutações que podem eventualmente ocorrer na posição Gly144 e Ala192.

A enzima EPSPS já foi sequenciada na totalidade nas espécies *Arabidopsis thaliana* (GenBank ac. no. AK227120.1) (Theologis *et al.*, 2000); *Lolium rigidum* (GenBank ac. no. AAK20397.1) (Baerson *et al.*, 2002), *Zea mays* (GenBank ac. no. X63374.1) (Lebrun *et al.*, 2005) e *Conyza canadensis* (GenBank ac. no. AY545667) (Heck *et al.*, 2004). No entanto, conhecendo-se a elevada probabilidade da mutação pro106 – numerada a partir da sequência de aminoácidos do milho (*Zea mays*) - se localizar numa zona altamente conservada da enzima, é suficiente sequenciar um fragmento do gene que contenha esse domínio (Ng *et al.*, 2003). Os primeiros estudos de sequenciação da EPSPS foram realizados a partir de DNA, o que permitiu detetar a presença de numerosos intrões (Theologis *et al.*, 2000; Baerson *et al.*, 2002). Porém, a maioria dos estudos utiliza cDNA, sintetizado a partir de RNA total, para obter apenas a sequência codificante da enzima “ativa” e respetivo péptido de transporte (González-Torralva, 2013).

Atualmente, quando se pretende quantificar os níveis de transcrição de um gene, recorre-se à PCR em tempo real, que é uma modificação da técnica convencional da PCR, na qual se pode acompanhar a síntese dos “amplicons” à medida que decorrem os ciclos (Brown, 2010). A deteção dos “amplicons” é feita por um módulo ótico de deteção da fluorescência emitida por fluoróforos

específicos adicionados à mistura de reação, juntamente com todos os restantes reagentes. Quatro diferentes tipos de marcadores fluorescentes, designadamente agentes de ligação ao DNA (SYBR Green), sondas de hidrólise (*TaqMan*), sondas “hairpin” (“molecular beacons”, “scorpions”), e sondas de hibridação marcadas com fluorescências (“Light Cycler”), têm sido usados para detetar, identificar e também quantificar a transcrição de genes (Walker *et al.*, 2009).

O uso da PCR em tempo real como forma de quantificação do número de cópias de mRNA de um gene em particular tornou-se, em relação à PCR clássica que só permitia a semi-quantificação, uma solução de mais elevada precisão. O parâmetro usado, como indicador da abundância relativa do transcrito é o Ciclo de “Threshold” (C_T), ou seja, o ciclo da PCR a partir da qual a fluorescência detetada, e devida à síntese de “amplicons”, é superior à fluorescência de “background” ou “baseline” e é inversamente proporcional ao logaritmo do número inicial de cópias da molécula padrão de DNA ou cDNA (Pfaffl, 2007). No decorrer da reação, as condições vão-se alterando o que pode influenciar a fluorescência. Em geral, a quantidade de fluorescência detetada em cada tubo de reação, corresponde à quantidade do gene de interesse presente. Contudo, há sempre uma quantidade residual de fluorescência provocada por alterações nas condições da reação. Isto é mais notório no início da reação, entre os ciclos 3 e 15, antes da acumulação significativa dos “amplicons” alvo (Pfaffl, 2007). C_T menores correspondem a deteções mais precoces, as quais se devem à presença de maiores quantidades iniciais de moléculas de DNA molde e, consequentemente, a maiores quantidades iniciais dos transcritos do gene (Walker *et al.*, 2009).

Embora a PCR em tempo real se tenha tornado na solução de “ouro”, é necessário ter presente que também apresenta algumas limitações: deve-se assegurar a disponibilidade de extratos de RNA de elevada qualidade ($A_{260}/A_{280} > 1,8$) de modo a reduzir a contribuição da síntese de cDNA para a incerteza total; a síntese de cDNA das amostras em estudo e dos controlos deve ser feita no mesmo momento e com o mesmo lote de transcriptase reversa e com os mesmos “primers”; a dificuldade em determinar a eficiência da reação de transcrição reversa exige a eleição de um bom gene de referência; o uso do fluoróforo SYBR Green, que se intercala em todos os “amplicons” de DNA de dupla cadeia gerados, aumenta a deteção de produtos inespecíficos, pelo que se deve sempre determinar a curva de “melting” e visualizar os “amplicons” após eletroforese em gel de agarose (Klein, 2002).

Uma quantificação absoluta obriga à contagem do número de moléculas de cDNA por nanograma de cDNA total utilizado na reação ou por número de moléculas de um gene de referência. Para tal, é necessário um padrão para o número de moléculas de cDNA (Ma *et al.*, 2006).

Através da determinação do C_T de amostras de concentração conhecidas mas diferentes (padrões), é possível traçar uma curva de calibração e determinar, por interpolação, a quantidade de transcritos do gene. Contudo, a produção, certificação para o número de moléculas e a comercialização de um padrão para cDNA não foi ainda possível. Assim, em alternativa, faz-se a quantificação relativa, ou seja, determina-se a expressão de um gene relativamente a outro de referência, o controlo interno, para a normalização dos dados. Os controlos internos correspondem a genes endógenos e têm a função de eliminar ou reduzir a variabilidade associada ao facto das amostras possuírem quantidades diferentes do RNA total que é extraído, atividade enzimática, etc. Devem-se eleger, como genes endógenos de referência, genes com um nível de expressão consistente, relativamente estável em todas as amostras (nos controlos e nas sujeitas às condições experimentais), nos diferentes tecidos do organismo e em todas as fases do seu desenvolvimento e a sua expressão não deve ser afetada pelas condições experimentais; sendo que os genes endógenos podem não ser invariáveis, devem escolher-se vários. Esta estratégia é particularmente útil quando existem muitos genes a serem testados sob diversas condições (Desroche *et al.*, 2005).

A taxa de expressão dos genes de referência deve ser aproximadamente da mesma ordem de grandeza da taxa de expressão dos genes em estudo e a sua estabilidade deve ser testada em todos os tecidos e células examinados. Em eucariotas, existe um grande número de genes que têm sido selecionados como genes de referência (Olsvik *et al.*, 2005). Em bactérias, não existe consenso relativamente à escolha do controlo interno e o mais frequente é a escolha de um controlo interno específico para cada estudo (Desroche *et al.*, 2005).

A quantificação relativa, por sua vez, pode ser abordada de três formas. O cálculo da diferença entre o C_T do gene em estudo e o do gene de referência (ΔC_T); o cálculo da diferença entre a diferença entre o C_T do gene em estudo e o C_T do gene de referência nas amostras em estudo e a diferença entre o C_T do gene em estudo e o C_T do gene de referência nas amostras controlo ($\Delta\Delta C_T$). Nesta situação, o cálculo das eficiências de amplificação do gene em estudo e do gene de referência deve ser realizado por recurso a curvas de calibração preparadas por diluições sucessivas. Todas as amostras devem ser analisadas em triplicado para determinação da precisão através da determinação do desvio padrão dos replicados (Ma *et al.*, 2006).

II. Materiais e métodos

3.1. Ensaios de determinação dos mecanismos de resistência

Foram realizados três ensaios para avaliar os mecanismos de resistência ao glifosato numa população resistente (R) de *C. canadensis* e uma população suscetível (S) como referência. Em cada estudo utilizaram-se os métodos referidos na bibliografia que foram otimizados para as condições de laboratório precisas.

O primeiro ensaio - determinação do shiquimato - teve como objetivo confirmar, de forma expedita, a resistência ao glifosato, independentemente do mecanismo responsável (Muller *et al.*, 2003; Walker e Preston, 2006) e foi realizado por espectrofotometria, no LRP / INIAV.

O segundo ensaio - detecção da presença de mutações pontuais no gene que codifica a enzima EPSPS-2, a partir da sequenciação de DNA e cDNA – teve por finalidade avaliar se a resistência resultaria da alteração do local de ação por insensibilidade da enzima ao glifosato.

Considerando que para o glifosato estão normalmente presentes mais do que um mecanismo de resistência na mesma planta, foi ainda realizado um terceiro ensaio para averiguar se a resistência resultaria de uma sobre-expressão do gene codificador da EPSPS-2, utilizando a técnica da PCR em tempo real.

3.2. Material vegetal

O material vegetal consistiu, durante alguns ensaios preliminares, em plantas das populações S (suscetível) e B4 (resistente) de *C. canadensis* e posteriormente, nos ensaios de otimização de métodos e nos ensaios definitivos, em plantas das populações B (suscetível) e B15 (resistente) de *C. canadensis*.

3.3. Ensaio de determinação de shiquimato

Para esta atividade adaptou-se o procedimento de Nol *et al.* (2012). Foram selecionados dois biótipos de *C. canadensis*, com diferente sensibilidade ao glifosato – um biótipo suscetível (biótipo B) e um biótipo resistente (biótipo B15). Para cada biótipo escolheram-se três plantas no estado de roseta através da excisão de sete discos de folhas, de 5 mm de diâmetro, de entre as nervuras principais das folhas mais jovens totalmente expandidas de cada planta. Os discos de folhas de cada biótipo, em grupos de três (derivados das três diferentes plantas), foram dispostos em catorze placas de Petri contendo duas folhas de papel de filtro e 10 mL de solução de glifosato, preparada em

solução tampão NaH_2PO_4 (10 mM, pH 4,4) com 0,1% de tensioativo Tween 20, correspondentes a sete concentrações do herbicida, divididas em gama baixa: 0; 0,9; 1,8 e 3,6 mg a.e. L^{-1} e gama alta: 9; 18 e 36 mg a.e. L^{-1} .

As placas de Petri foram seladas com *Parafilm* de modo a reduzir a evaporação e incubadas em câmara de crescimento (25 °C, r.h. 75%) durante 16 h sob luz contínua ($200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Todos os discos em cada placa de Petri foram cortados em tiras finas com ajuda de bisturi e só então transferidos para tubos de centrifugadora (Falcon) e o shiquimato foi extraído adicionando 1 mL de HCl 0,25M a cada tubo. De seguida, estes foram agitados em vortex durante 1 min a 2500 rpm, congelados (-24 °C) e descongelados (30 min), e as amostras incubadas durante 30 min a 37 °C.

Após a centrifugação a 4 000 g durante 10 min, transferiram-se 0,5 mL do sobrenadante para tubos contendo 2 mL de solução tampão de periodato 0,25 % para oxidar o shiquimato. Após incubação a 37 °C, durante 30 min, em câmara incubadora, adicionaram-se a cada tubo 2 mL de solução-mista de NaOH 2,4 % e Na_2SO_3 2,78 %.

Para a determinação da concentração de shiquimato nas amostras de tecido vegetal, preparou-se uma série de diluições a partir de soluções-mãe de concentração 40,0 mg L^{-1} e 1,00 g mL^{-1} . A partir da solução de concentração intermédia, prepararam-se oito padrões de shiquimato com concentrações 0,1; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 3,0; 4,0 e 5,0 mg mL^{-1} . Todas as diluições foram feitas em solução HCl 0,25 M. Preparou-se ainda um padrão contendo apenas HCl.

Seguidamente transferiram-se 0,5 mL de cada padrão para balões volumétricos contendo 2,00 mL de solução tampão de periodato. Após incubação a 37 °C, durante 30 min, em câmara incubadora, adicionaram-se a cada tubo 2 mL de solução-mista. Posto isto, mediram-se as absorvâncias dos padrões a 380 nm em espectrofotómetro de duplo feixe (Jasco V-530) e a partir dos valores obtidos traçou-se a curva de calibração. Por último, mediram-se as absorvâncias (a 380 nm) dos tubos que continham shiquimato proveniente das plantas.

3.4. Sequenciação do gene da EPSPS-2

3.4.1. Sequenciação de DNA

Ensaio preliminar para determinação da amplificabilidade do DNA

A fim de determinar a qualidade do DNA obtido para ser amplificado por PCR (ausência de inibidores da polimerase de DNA), averiguou-se a sua aptidão através da amplificação de uma sequência conhecida e presente em todos os DNA de cloroplasto. A respetiva PCR foi realizada numa mistura reacional de 25 μL , usando um termociclador Techne Touchgene Gradient. A mistura

reacional continha 1xTampão de *Taq*, 1,5 mM de $MgCl_2$, 0,2 mM de dNTPs (CTP, ATP, GTP, TTP), 0,2 μM de cada primer *Clor*, 0,026 unidades de *Taq* DNA polimerase (BioTaq Bioline) e 5 μL de solução de DNA. Os ciclos térmicos consistiram num passo de desnaturação de 4 min a 94 °C, 35 ciclos de 30 s a 94 °C, 30 s a 65 °C e 100 s a 72 °C, seguido de um passo final de extensão das extremidades de 5 min a 72 °C.

Ensaio de otimização do protocolo de amplificação do gene epsps-2

Para a otimização das condições da PCR para a amplificação da sequência de DNA (desconhecida) que codifica para a enzima EPSPS-2, recorreu-se a um termociclador de gradiente para testar em simultâneo diferentes temperaturas de “annealing” – 51, 55, 57 e 59 °C - e a duas soluções “master mix” com diferentes concentrações de $MgCl_2$ – 4,5 mM e 5,5 mM. Ambas as misturas reacionais, com volume final de 20 μL , continham 1xTampão de *Taq*, 0,75 mM de dNTPs (CTP, ATP, GTP, TTP), 0,375 μL de cada “primer” complementar com a sequência do gene da EPSPS-2, 0,25 unidades de *Taq* DNA polimerase (BioTaq Bioline) e 3 μL de solução de DNA. Os ciclos térmicos consistiram num passo de desnaturação inicial de 4 min a 94 °C seguido de 40 ciclos de 30 s a 94 °C, 30 s às diferentes temperaturas de “annealing”, e 1 min a 72 °C, seguido de um passo final de extensão das extremidades de 7 min a 72 °C. Usou-se um termociclador Techne Touchgene Gradient e, como o objetivo deste passo era otimizar as condições experimentais, usou-se arbitrariamente a amostra B4.

As condições de PCR para o DNA de EPSPS-2 foram inicialmente otimizadas usando os “primers” *EPS-180*, ou seja, usaram-se os mesmos “primers” que mais tarde seriam usados na PCR em tempo real. Estes “primers” apenas cobrem uma região de cerca de 800 pb que não inclui a mutação relatada para *C. canadensis*, ou seja, não incluem a região que codifica a Pro106. Contudo, estes resultados serviram de base para as posteriores otimizações das condições de PCR em tempo real.

Ensaio definitivo

A PCR para amplificação da sequência (desconhecida) que codifica para a enzima EPSPS-2 foi realizada numa mistura reacional de 20 μL , usando um termociclador Techne Touchgene Gradient. A mistura reacional continha 1xTampão de *Taq*, 5,5 mM de $MgCl_2$, 0,75 mM de dNTPs, 0,188 μM de cada “primer” *EPS-180*, 0,25 unidades de *Taq* DNA polimerase (BioTaq Bioline) e 3 μL de solução de DNA. A programação dos ciclos consistiu num passo de desnaturação de 4 min a 94 °C, 40 ciclos de 30 s a 94 °C, 30 s a 59 °C e 1 min a 72 °C, seguido de um passo final de extensão de 7 min a 72 °C.

3.4.2. Seleção de “primers”

Neste estudo foram utilizados cinco par de “primers” diferentes (Quadro 7). Os “primers” *EPS-1200* e *EPS-180* foram usados para amplificar o gene em estudo, os “primers” *EF-1* e *18S* para amplificar os genes endógenos de referência, e os “primers” *Clor* para amplificar o DNA de cloroplasto. Os “primers” *EPS-180* e *EF-1* são os mesmos usados por Dinelli *et al.* (2006).

Os “primers” *EPS-180* flanqueiam uma região do DNA genómico que não possuiu intrões (anexo I). Consequentemente, estes “primers” poderão amplificar as respetivas regiões do DNA genómico, caso este se encontre presente na mistura reacional. Como as amostras não foram submetidas a tratamento com DNase, RNase “free”, poderão possuir resíduos de DNA genómico passível de ser amplificado durante a PCR, o qual afetaria a exatidão dos resultados, pois não seria possível determinar qual a fração de “amplicons” resultante do DNA genómico. Para ultrapassar este problema, usaram-se os “primers” *EPS-1200*, que flanqueiam uma região maior do DNA genómico que possui intrões, sendo o seu comprimento de aproximadamente 7000 pb. Condicionando a fase de extensão da PCR a um período de tempo muito curto, este fragmento não pode ser amplificado a partir do DNA genómico. Desta forma, apenas se determina a quantidade de cDNA específica para cada gene que é expresso.

Os extratos de RNA destinados à quantificação de um determinado mRNA, não devem estar contaminados com DNA genómico. Isto é muito importante para uma quantificação precisa dos transcritos, especialmente dos genes com baixos níveis de expressão, logo com um número reduzido de cópias presente. Assim, os extratos de RNA devem sofrer uma digestão com DNase I, RNase “free”. Caso se verifiquem grandes perdas de RNA durante a purificação com clorofórmio e precipitação com etanol, então devem desenhar-se “primers” que não permitam a amplificação do DNA genómico. Com os “primers” *EPS-1200*, consegue-se amplificar um fragmento de 1200 pb a partir do cDNA e um de cerca de 7000 pb a partir do DNA genómico, devido à presença de um intrão com cerca de 5800 pb. O passo de extensão da nova cadeia ou polimerização dos nucleótidos foi programado para 2 min o que não permite a amplificação de 7 Kb, para além de que não se usou uma DNA polimerase melhorada para longas amplificações. A sequência dos “primers” foi selecionada na sequência do gene *epsps-2* seguindo a regra empírica de que o conteúdo em guaninas e citosinas não deve ultrapassar 45% do total de desoxirribunucleótidos. Para os “primers” *18S* e *Clor* foi seguida a mesma regra.

3.4.3. Quantificação do DNA

O DNA total foi extraído a partir de 70 a 100 mg tecido foliar de plantas frescas das populações S, B4, B e B15 usando um método de extração baseado no método do brometo de hexadeciltrimetilamónio (CTAB, do inglês “hexadecyltrimethylammonium bromide”) (Anexo II).

A determinação da concentração do DNA nos extratos obtidos foi feita com recurso ao espectrofotómetro NanoDrop 2000 (Termo Scientific) e respetivo “software” de apoio. A concentração de DNA também foi determinada através do método do PicoGreen. Para tal, dilui-se 200 vezes o reagente Quant-iT™ PicoGreen e 10 vezes a solução de λ DNA 100 ng/ μ L (solução padrão) (Quadro 3). Fizeram-se dois replicados para cada padrão e para o branco (1+2) e um replicado para cada amostra (1+1), um controlo negativo (branco) da *mix* e um controlo negativo (branco) ambiental. O equipamento usado para fazer as medições foi o Rotor-Gene Q (Qiagen) e o “software” de apoio foi o Rotor-Gene 1.7.94 (Qiagen).

Quadro 3. Composição das soluções dos padrões de λ DNA e do controlo negativo.

Volume de solução de λ DNA [10 ng/ μ L] (μ L)	Volume de H ₂ O (μ L)	Volume de Quant-iT™ PicoGreen (μ L)	Concentração final do λ DNA (ng/ μ L)
5	0	45	1
4	1	45	0,8
3	2	45	0,6
2	3	45	0,4
1	4	45	0,2
0	5	45	0 (controlo)

3.4.4. Sequenciação de cDNA

Amplificação do fragmento de cDNA de 180 pb

O RNA total foi extraído a partir de tecido foliar de plantas frescas das populações B e B15 usando o “illustra RNAspin Mini Kit” (GE Healthcare Life Sciences) e a síntese da primeira cadeia de cDNA foi realizada a partir do RNA total usando o “qScript cDNA Synthesis Kit” (Quanta Biosciences), seguindo exatamente as recomendações do fabricante. A PCR foi realizada numa mistura reacional de 20 μ L, usando um termociclador Techne Touchgene Gradient. A mistura reacional continha 1xTampão de *Taq*, 5,5 mM de MgCl₂, 0,75 mM de dNTPs, 0,188 μ M de cada *primer* EPS-180, 0,25 unidades de *Taq* DNA polimerase (BioTaq Bioline) e 5 μ L de cDNA molde. A programação dos ciclos consistiu num passo de desnaturação de 4 min a 94 °C, 40 ciclos de 30 s a 94 °C, 30 s a 59 °C e 1 min a 72 °C, seguido de um passo final de extensão de 7 min a 72 °C.

Amplificação do fragmento de cDNA de 1200 pb

O RNA total foi extraído a partir de tecido foliar de plantas frescas das populações B e B15 usando o “kit Direct-zol™ RNA MiniPrep” (Zymo Research) e a síntese da primeira cadeia de cDNA foi realizada a partir do RNA total usando o kit “SuperScript® III First-Strand Synthesis System for RT-PCR” (Invitrogen), seguindo exatamente as recomendações do fabricante. A PCR foi realizada numa mistura reacional de 20 µL, usando um termociclador Techne Touchgene Gradient. A mistura reacional continha 1xTampão de *Taq*, 5,5 mM de MgCl₂, 0,75 mM de dNTPs, 0,188 µM de cada “primer” *EPS-1200*, 0,25 unidades de *Taq* DNA polimerase (BioTaq Bioline) e 5 µL de cDNA molde. A programação dos ciclos consistiu num passo de desnaturação de 4 min a 94 °C, 40 ciclos de 30 s a 94 °C, 30 s a 59 °C e 1 min a 72 °C, seguido de um passo final de extensão de 7 min a 72 °C.

3.4.5. Separação dos fragmentos de DNA e cDNA

Após amplificado por PCR, os fragmentos de DNA e cDNA foram separados dos restantes componentes da reação por eletroforese em gel de agarose 1,5%. Preparou-se o gel dissolvendo a agarose em tampão Tris-Acetato-EDTA (TAE, tampão de eletroforese). A formulação do tampão TAE encontra-se no anexo III. Usou-se o marcador do peso molecular “DNA Ladder I” (Bioline), que é composto por fragmentos de 200 a 12,000 bp, e o DNA “ladder” de 100 bp Blue/Orange 6x Loading Dye (Promega), o qual facilita o carregamento e a monitorização das amostras de DNA no gel de eletroforese, a uma voltagem de 78 Volts que correspondeu a 3,9 V cm⁻¹. O gel de agarose foi posteriormente mergulhado em solução de brometo de etídeo (5 mg mL⁻¹) durante cerca de 30 a 40 min sob agitação.

3.5. Ensaio de determinação da expressão génica

A determinação da expressão relativa do gene codificador da EPSPS-2 foi realizada através da PCR em tempo real, numa mistura reacional de 15 µL, usando um termociclador Rotor-Gene Q (Qiagen). O RNA total foi extraído a partir de tecido foliar usando o kit “Direct-zol™ RNA MiniPrep” (Zymo Research) e a síntese da primeira cadeia de cDNA foi realizada a partir do RNA total extraído usando o kit “SuperScript® III First-Strand Synthesis System for RT-PCR” (Invitrogen).

Frequentemente, recorre-se a dois métodos para quantificar o número de cópias de cDNA originadas a partir do mRNA do gene de interesse: i) o método da curva padrão de calibração, para efetuar uma quantificação do gene de interesse por inferência, e ii) o método da comparação do limiar inferior da fase exponencial (pontos de inflexão) traduzidos pelo valor do C_T, entre o gene de

interesse e um gene de referência com transcrição constante, o que permite uma quantificação relativa (Pelt-Verkuil *et al.*, 2008). Neste estudo foi usado o método da comparação do limiar da fase exponencial (“threshold”) ou método comparativo C_T , que consiste na comparação dos valores de C_T do gene de interesse e do gene de referência das amostras com os de um controlo. Os valores de C_T de ambos foram normalizados para um gene endógeno apropriado, o *ef1- α* . Este método também é conhecido como o método $2^{-\Delta\Delta C_T}$, onde $\Delta\Delta C_T = \Delta C_{T(\text{amostra})} - \Delta C_{T(\text{referência})}$. Nesta equação, $\Delta C_{T(\text{amostra})}$ é o valor de C_T para qualquer amostra normalizada e $\Delta C_{T(\text{referência})}$ é o valor de C_T para o controlo normalizado. Para que o cálculo de $\Delta\Delta C_T$ seja válido, as eficiências da amplificação do gene em estudo e do gene de referência devem ser aproximadamente iguais (Ma *et al.*, 2006) (Anexo VI).

Ensaio de otimização

Para otimização da reação, realizaram-se ensaios sucessivos, fazendo variar, por ordem cronológica, a temperatura de “annealing”/extensão, o tempo de “annealing”/extensão e a concentração dos “primers”. O fator orientador do processo de otimização foi a qualidade da amplificação do fragmento correspondente aos “primers” *EPS-180*. Isto porque, para os “primers” *EF-1*, os resultados não foram reprodutíveis até o método estar otimizado (Quadro 4).

Quadro 4. Parâmetros analisados na otimização do ensaio de determinação da expressão génica e respetivos resultados.

Parâmetro	Ensaio de otimização	Resultado
Ensaio base	10 min a 95 °C 40 ciclos de 13 s a 95 °C e 30 s a 60 °C	<i>EPS-180</i> : positivo <i>EF-1</i> : negativo
Tempo de “annealing”	10 min a 95 °C 40 ciclos de 13 s a 95 °C e 60 s a 60 °C	Positivo
RNA tratado		<i>EPS-180</i> : positivo <i>EF-1</i> : negativo
RNA tratado	10 min a 95 °C	<i>EPS-180</i> : positivo
Temperatura de “annealing”	40 ciclos de 13 s a 95 °C e 60 s a 59 °C	<i>EF-1</i> : 50% positivo
RNA não tratado		Positivo
Aplicação de herbicida		<i>EPS-180</i> : positivo <i>EF-1</i> : negativo
Novo SYBR green		<i>EPS-180</i> : positivo <i>EF-1</i> : negativo
Tempo de “annealing”	10 min a 95 °C 40 ciclos de 13 s a 95 °C e 120 s a 59 °C	<i>EF-1</i> : positivo
Aplicação de herbicida	10 min a 95 °C 40 ciclos de 13 s a 95 °C e 120 s a 59 °C	Positivo
RNA tratado		Positivo
“Primer” 18S		Positivo
“Primer” <i>EPS-1200</i>		Positivo

Ensaio definitivo

A mistura reacional continha 1 x SYBR Green e, consoante as amostras, 0,267 μ M de cada “primer” *EPS-180*, *EPS-1200* ou *18S*, e 0,200 μ M de cada “primer” *EF-1*, e 150 ng de cDNA. A programação dos ciclos consistiu num passo de desnaturação de 10 min a 95 °C e 40 ciclos de 13 s a 95 °C, 120 s a 59 °C e 5 s a 50-99 °C, este último para determinação do valor da temperatura de “melting”.

3.6. Análise estatística

A análise dos dados começou pela Análise de Variância (ANOVA) Simples, sendo a hipótese nula (H_0) a existência de igualdade da acumulação de shiquimato entre os indivíduos das populações B e B15. Nos ensaios de expressão génica, determinaram-se as médias e desvios padrão para estudar as semelhanças e diferenças entre os valores. Seguiu-se o teste à normalidade da distribuição amostral através do teste de Shapiro-Wilk e, posteriormente, a ANOVA, sendo a hipótese nula (H_0) a existência de igualdade entre as médias das expressões relativas aos indivíduos da mesma população. Para ambas as análises, estipulou-se o nível de significância $\alpha = 0,05$. Todos estes resultados foram obtidos através do programa estatístico R versão 3.1.1.

Para avaliar a possível presença de diferenças significativas na expressão génica da EPSPS-2 entre os indivíduos suscetíveis e resistentes, procedeu-se às comparações múltiplas, através do teste t de *student*, estipulando a hipótese nula (H_0) como a existência de igualdade entre a expressão génica relativa entre os indivíduos suscetíveis e resistentes.

III – Resultados e discussão

4.1. Ensaio de determinação do shiquimato

Pela análise dos gráficos das figuras 6 e 7, observa-se que a concentração basal de shiquimato (valores correspondentes a $[\text{glifosato}] = 0 \text{ mg a.e. L}^{-1}$) é superior nas plantas B ($0,062 \text{ mg L}^{-1}$) relativamente às plantas B15 ($0,042 \text{ mg L}^{-1}$). A ANOVA (fator único) resultou na rejeição da igualdade entre as concentrações de shiquimato dos indivíduos B e B15, tanto para a gama baixa ($p\text{-value} \approx 0,66$), como para a gama alta ($p\text{-value} \approx 0,65$) de concentrações de glifosato. Para a gama baixa de concentrações (Fig. 6), embora ocorram oscilações, observa-se que os valores da concentração de shiquimato são sempre superiores nas plantas B, podendo-se afirmar que as plantas B15 toleram melhor um meio contendo glifosato. Para a gama alta de concentrações de glifosato, verifica-se a acumulação de shiquimato nas plantas B, ao passo que este quase não varia na população B15.

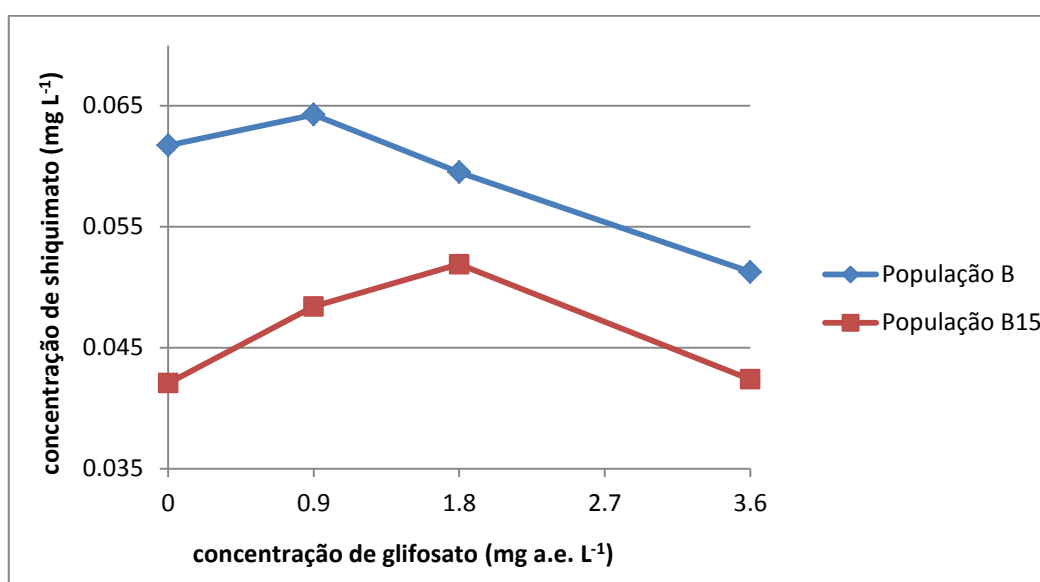


Figura 6. Evolução da acumulação do shiquimato nos discos de folhas de *Conyza canadensis*, na presença de baixas concentrações de glifosato.

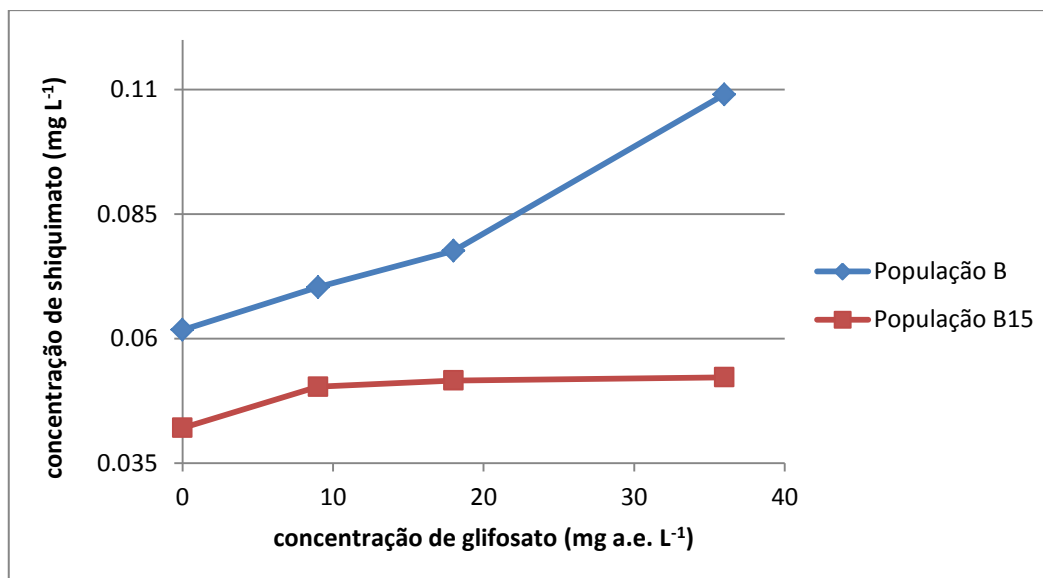


Figura 7. Evolução da acumulação do shiquimato nos discos de folhas de *Conyza canadensis*, na presença de altas concentrações de glifosato.

Este ensaio de determinação do shiquimato revelou ser eficaz como método de confirmação, pois as populações estudadas foram previamente identificadas como suscetível (B) e resistente (B15) por Mendes (2011) através de ensaios de dose-resposta.

Segundo Nol *et al.* (2012), os diferentes biótipos podem ser caracterizados com maior precisão através dos valores do declive e da ordenada na origem das equações das retas ajustadas para a concentração de shiquimato em função da concentração de glifosato, dado que quando o respetivo valor do coeficiente de determinação (r^2) é superior a 0,85 pode-se considerar que o ajustamento linear é adequado. No quadro 5 observa-se que, para os valores de gama alta, tanto a concentração de shiquimato, como o seu logaritmo, estão linearmente correlacionados com a concentração de glifosato; ao passo que para os valores de gama baixa existe forte correlação linear para os valores correspondente à população B, mas fraca correlação linear para os valores correspondentes à população B15 para os dois modelos linear e logarítmico. Para a gama alta de concentrações, analisando os valores dos declives, verifica-se que em ambos os casos este valor é superior no biótipo B comparativamente ao B15 (cerca de 21 e 20 vezes para o modelo linear e logarítmico, respetivamente), evidenciando uma acumulação de shiquimato superior no biótipo B; quanto aos valores das ordenadas na origem, verifica-se que, no caso do modelo linear, estes são da mesma ordem, mas de ordem diferente no caso do modelo logarítmico. Porém, comparando as equações que têm um $r^2 > 0,96$, ou seja, os modelos mais precisos, observa-se que estes valores são relativamente próximos, sendo isto um indício da igualdade dos níveis basais da enzima EPSPS-2 nas duas populações.

Quadro 5. Equações lineares e logarítmicas correspondentes à acumulação de shiquimato nos discos de folhas de *Conyza canadensis*. “y” corresponde à concentração de shiquimato e “x” à concentração de glifosato. Não são considerados os valores basais de concentração de shiquimato, ou seja, os valores correspondentes a [glifosato] = 0 mg a.e. L⁻¹.

		Linear		Logarítmica	
	Biótipo	Equação	r ²	Equação	r ²
gama alta	B	$y = 1,5 \times 10^{-3}x + 0,0546$	0,9761	$y = 2,79 \times 10^{-2} \ln(x) + 0,0049$	0,8855
	B15	$y = 7 \times 10^{-5}x + 0,05$	0,8622	$y = 1,4 \times 10^{-3} \ln(x) + 0,0474$	0,9643
gama baixa	B	$y = -0,0048x + 0,0684$	0,9987	$y = -0,009 \ln(x) + 0,0639$	0,9766
	B15	$y = -0,0027x + 0,0532$	0,5807	$y = -0,004 \ln(x) + 0,0501$	0,3918

A determinação dos níveis de shiquimato permite inferir acerca de uma possível alteração no sítio-alvo. Exceto nas plantas tolerantes e geneticamente modificadas, biótipos S tendem a acumular mais shiquimato comparativamente aos resistentes após a aplicação de glifosato (Gonzalez-Torralva *et al.*, 2013). Uma das vantagens deste procedimento (com discos de folhas) relativamente aos ensaios com planta inteira é a possibilidade de se excluir a translocação diferencial como um possível mecanismo de resistência, o qual não pode ocorrer em discos de folhas. Contudo, este ensaio não exclui todos os mecanismos de resistência fora do local de ação, como, por exemplo, a compartimentação do herbicida no vacúolo, observado por Nol *et al.* (2012) em *C. canadensis*.

Mueller *et al.* (2003) observaram a acumulação de shiquimato numa população de um biótipo resistente de *C. canadensis* dois dias após a aplicação de glifosato, relativamente a uma população do mesmo biótipo que não tinha sido submetida a aplicação. Contudo, ao compararem duas populações correspondentes a dois biótipos R e uma população de um biótipo S, dois e quatro dias após a aplicação de glifosato, verificaram que ao segundo dia as concentrações médias de shiquimato das populações R eram superiores à concentração média da população S e que, contrariamente à população S, cuja concentração média de shiquimato aumentara do segundo para o quarto dia, evidenciando a acumulação de shiquimato, nas populações R as concentrações de shiquimato tinham diminuído, ou seja, o shiquimato tinha sido metabolizado.

Mueller *et al.* (2003) sugerem que o mecanismo de resistência ao glifosato em *C. canadensis* não é devido simplesmente a uma alteração da EPSPS, apresentando várias hipóteses possíveis. A primeira afirma que vários genes que codificam para isoformas da EPSPS poderão estar presentes, sendo responsáveis pela variação dos níveis de inibição do glifosato. A segunda infere acerca da possível existência de uma enzima do tipo glifosato oxidoreductase, a qual aceleraria a degradação normal do glifosato em ácido aminometilfosfórico e glioxilato. Isto poderia apoiar a hipótese da biossíntese de uma forma secundária e alterada da EPSPS, a qual seria induzida aquando da

exposição das plantas resistentes ao *stresse* causado pela aplicação de glifosato. Contudo, não foram documentadas espécies selvagens não transformadas possuidoras de genes codificando para uma enzima do tipo glifosato oxidoreductase (GOX). Por último, estes autores sugerem ainda a presença de uma EPSPS alterada e resistente que seria expressa após a ligação do glifosato à forma suscetível da EPSPS, a qual levaria à alteração do crescimento devido à falta de aminoácidos aromáticos, desencadeando assim a expressão da forma alterada, que por sua vez reestabeleceria a via do shiquimato.

4.2. Sequenciação do gene da EPSPS-2

4.2.1. Sequenciação de DNA

Ensaio preliminar com DNA de cloroplasto

A fim de determinar a qualidade do DNA obtido, amplificou-se uma sequência conhecida do DNA do cloroplasto, seguida de eletroforese em gel de agarose 1,5% do fragmento amplificado.

Na figura 8 pode-se observar, em cada coluna, uma banda no gel com cerca de 700 pb que corresponde ao “amplicon” esperado. Assim, conclui-se que o DNA de todos os extratos obtidos tem qualidade suficiente para ser amplificado por PCR.

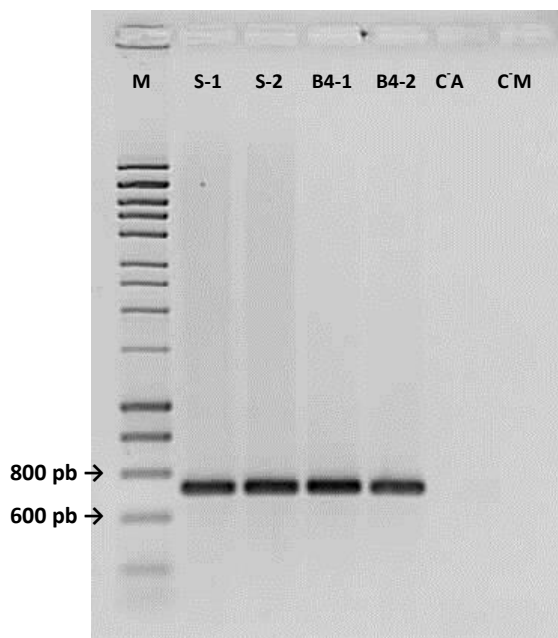


Figura 8. Perfil eletroforético correspondente ao fragmento de DNA de cloroplasto. M é o marcador de peso molecular (Hyperladder II, Bionline), S-1, S-2, B4-1 e B4-2 são as duas amostras de DNA de *Conyza canadensis* S e B4, respetivamente, C^A é o controlo negativo ambiental e C^M é o controlo negativo da “mix”.

Ensaio de otimização do método

Primeiramente otimizaram-se as temperaturas de “annealing” dos “primers” *EPS-180* e a concentração de Mg^{2+} na “mix” de PCR (Fig. 9). A partir deste ponto, utilizaram-se as populações B (suscetível) e B15 (resistente).

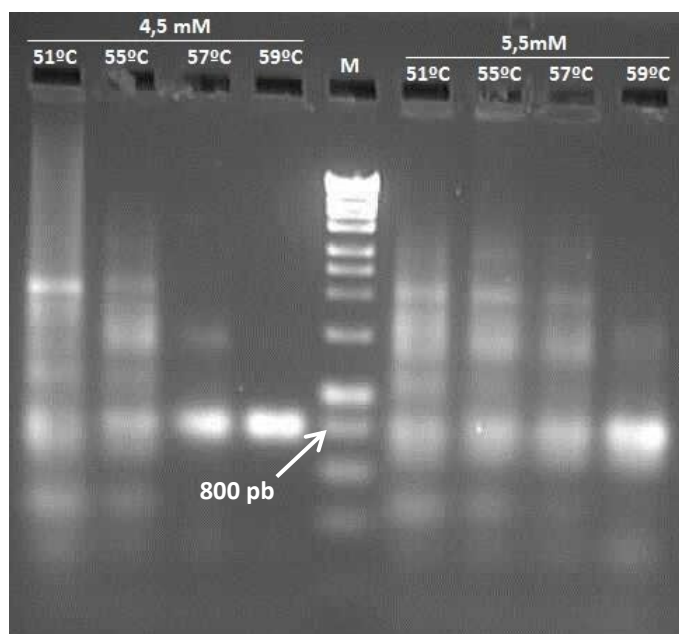


Figura 9. Perfil eletroforético obtido para a PCR de EPSPS-2 com gradiente de temperatura e duas concentrações diferentes de Mg. M é o marcador de peso molecular (Hyperladder II, Bioline).

Posteriores repetições confirmaram que a temperatura de “annealing” e a concentração de Mg^{2+} ótimas são 59 °C e 5,5 mM, respetivamente. Note-se que, embora estas condições permitam obter os fragmentos de DNA esperados, muitas das vezes estes não apresentaram qualidade ou quantidade suficiente para uma sequenciação eficaz. Realizaram-se diversos ensaios de otimização das concentrações dos “primers” *EPS-180* e dos dNTPs. Estes não foram conclusivos, ou seja, não permitiram ganhos observáveis na qualidade dos fragmentos. Além da temperatura de “annealing” e concentração de Mg^{2+} , outros fatores determinantes da qualidade dos produtos finais foram: a qualidade do RNA extraído e o tamanho do fragmento (Qiagen, 2011). Este último pressuposto deve-se ao facto de não ter sido possível otimizar as condições de PCR para cDNA (180 pb) de EPSPS, devido à grande dificuldade em obter-se bandas e à impossibilidade de sequenciar os respetivos fragmentos.

Ensaio definitivo

Uma vez otimizadas as condições de PCR, o DNA correspondente ao fragmento de 800 pb foi amplificado e sequenciado.

Pela observação do quadro 6, conclui-se que apenas uma parte da sequência obtida corresponde à região codificante, a qual não inclui a região em estudo, ou seja, a região que contém a prolina 106. Contudo, como já foi referido, as condições otimizadas neste ensaio serviram de base ao ensaio seguinte, razão pela qual não foi necessário proceder à otimização das condições de PCR para cDNA.

Quadro 6. Alinhamento das sequências codificantes obtidas com a sequência codificante no sentido “forward” (5’-3’) da EPSPS-2 de *Conyza canadensis* (GenBank ac. no. AY545667).

<i>C. canadensis</i>	GDVKFAEVLGQMETGAEVTWTENSVTVKGPPRNSSGRGHLRPVDVNMETN
B	GDVKFAEVLGQMETGAEVTWTENSVTVKGPPRNSSGRGHLRPVDVNMETN
B15	GDVKFAEVLGQMETGAEVTWTENSVTVKGPPRNSSRKCTL

4.2.2. Seleção de “primers”

No quadro 7 apresentam-se os “primers” utilizados neste trabalho. A seleção dos “primers” *EPS-180* e *EF-1* foi feita por pesquisa bibliográfica, sendo estes “primers” os mesmos usados por Dinelli *et al.* (2006). Os restantes foram selecionados com base nas sequências nucleotídicas dos respetivos genes (GenBank) e na regra empírica citada no ponto 3.4.2.

Quadro 7. Quadro-resumo dos “primers” usados: nome dado ao par, nome do componente codificado pelo respetivo gene alvo, sequências nucleotídicas do “primer forward” (F) e “reverse” (R), tamanho dos fragmentos esperados e número de acesso do respetivo gene no Genbank.

Nome	Componente	Sequência	Fragmento (pb)	GenBank
Clor	Cloroplasto	F: 5'-CGAAATCGGTAGACGCTACG-3' R: 5'-GGGGATAGAGGGACTTGAAC-3'	DNA: 700	Z00044, X15901
EPS-180	EPSPS-2	F: 5'-GTTGCGGGACAAGCA-3' R: 5'-AGGGCAACCACAGCAA-3'	DNA: 800 cDNA: 180	AY545667
EPS-1200	EPSPS-2	F: 5'-GCAGTTCACATCAACAACCTCCA-3' R: 5'-CAGGTTACTTCAGCGCCCATTT-3'	cDNA: 1200	AY545667
EF-1	Elongation Factor 1 α	F: 5'-TTAAGGCCGAGCGTG-3' R: 5'-CGAAGGGGCTTGTCTGA-3'	cDNA: 500	AK221176
18S	18S	F: 5'-CCATCCCTCCGTAGTTAGCTTCT-3' R: 5'-CCTGTCGGCCAAGGCTATATAC-3'	cDNA: 150	EU953856.1

4.2.3. Quantificação do DNA

Para avaliar a exatidão da determinação da concentração de DNA nas amostras em estudo, compararam-se os valores obtidos através do espectrofotômetro *NanoDrop* 2000 (Termo Scientific) com os valores obtidos pelo método do *PicoGreen* (Invitrogen). Nesta fase do trabalho utilizaram-se as populações S (sensível) e B4 (resistente) (Quadros 8 e 9).

Nas posteriores quantificações de DNA, RNA e cDNA, apenas se recorreu ao método espectrofotométrico (*NanoDrop* 2000), por este ser um método muito mais rápido e mais económico que o método do *PicoGreen* e por ser suficientemente preciso. Além disto, na maioria dos ensaios realizados, o mais importante era a determinação da qualidade das amostras, a qual é possível recorrendo aos valores de A_{260}/A_{280} e A_{260}/A_{230} fornecidos pelo espectrofotômetro *NanoDrop* 2000 (Termo Scientific) e respetivo “software” de apoio (Quadro 8). Para ambas as amostras obteve-se apenas um pico a cerca de 260 nm.

Quadro 8. Absorvâncias das amostras de DNA extraído de folhas de indivíduos das populações S e B4 de *C. canadensis*.

	S-1	S-2	B4-1	B4-2
Concentração de DNA (ng/μL)	17,5	67,5	35,5	42,9
Absorvância a 260 nm (A_{260})	0,349	1,351	0,710	0,859
Absorvância a 280 nm (A_{280})	0,166	0,713	0,363	0,443
A_{260}/A_{280}	2,11	1,89	1,95	1,94
A_{260}/A_{230}	2,24	2,3	2,28	2,35

O Quant-iT™ *PicoGreen* é um reagente ultrasensível que emite fluorescência quando se liga ao DNA de cadeia dupla em solução. Na ausência de ligação, não é detetada fluorescência (Ahn *et al.*, 1996). Assim, um dado volume DNA em solução é adicionado a um dado volume de *Picogreen*, podendo a amostra de DNA ser dissolvida em água, para posterior medição da fluorescência e determinação da concentração (Quadro 9), a partir dos padrões de concentração conhecida (ver 3.4.3).

Quadro 9. Composição das soluções das amostras e concentrações de DNA obtidas pelo método do PicoGreen. As concentrações de DNA correspondem à média da amostra e do replicado.

Amostras	Concentração de DNA [ng/ μ L]	Volume amostra de DNA (μ L)	Volume de H ₂ O (μ L)	Volume de Quant-iT™ PicoGreen (μ L)
S-1	27,84	2	3	45
S-2	58,27			
B4-1	73,83			
B4-2	42,13			

4.2.4. Amplificação do fragmento de 1200 pb

Este passo teve como objetivo a sequenciação da região de interesse do gene codificador da EPSPS-2, ou seja, da região contendo a sequência codificadora do aminoácido prolina da posição 106, na qual ocorrem as mutações responsáveis pela insensibilidade da enzima ao glifosato.

Partindo das condições usadas para o fragmento de DNA de 800 pb, procedeu-se à amplificação do fragmento de cDNA de 1200 pb. Neste passo, usaram-se cDNAs cujos respectivos RNAs tinham sido tratados com DNase e cDNAs sem tratamento. Usou-se novamente um gradiente de temperatura de “annealing”.

Pela observação do perfil eletroforético obtido (Fig. 10), pode-se constatar que a reação de amplificação foi eficaz para um largo intervalo de temperaturas, mas apenas nas amostras não submetidas a tratamento prévio com DNase I, RNase free. No caso das amostras sem tratamento, verifica-se que no intervalo de temperaturas de 55,7 °C a 57,2 °C, todos os fragmentos amplificaram eficazmente, como se pode observar pela nitidez das bandas e, no caso das amostras correspondentes à população B, este intervalo estende-se até 60 °C. Portanto, verifica-se um incremento da robustez do método ao passar dos “primers” *EPS-180* para os “primers” *EPS-1200*.

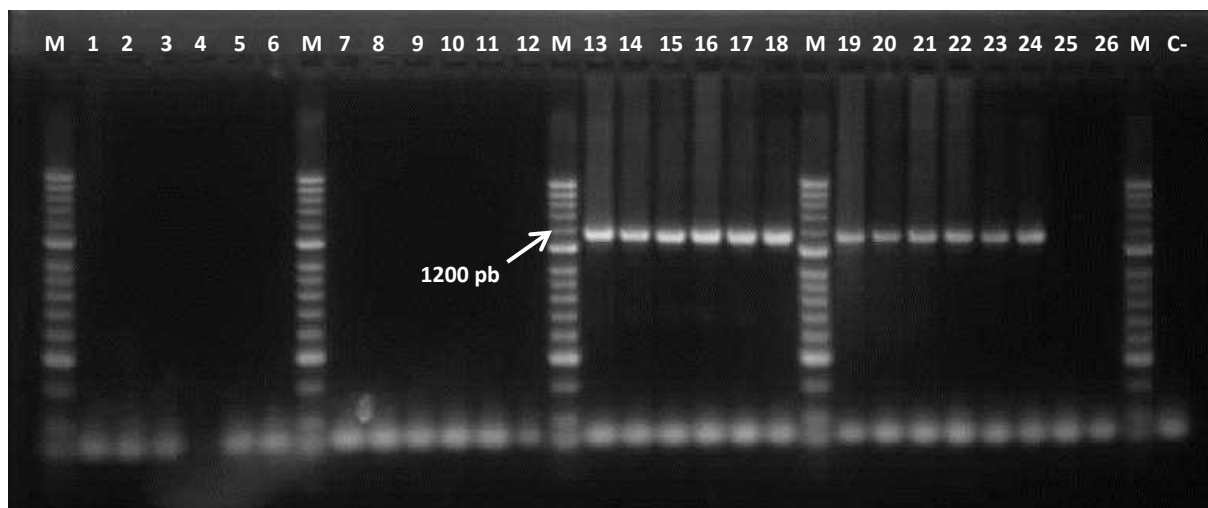


Figura 10. Perfil eletroforético obtido para a PCR de EPSPS-2 usando os “primers” *EPS-1200*, com gradiente de temperatura. As amostras 1-12 correspondem a cDNA obtido a partir de RNA tratado com DNase I, RNase free; as amostras 13-26 correspondem a cDNA obtido a partir de RNA não tratado com DNase; as amostras 1-6 e 13-18 correspondem à planta suscetível e as amostras 7-12 e 19-26 correspondem à planta resistente. Em cada um dos quatro casos, o gradiente de temperatura, da esquerda para a direita, foi: 55,7, 56,1, 56,7, 57,2, 58,1 e 60,0 °C. M é o marcador de peso molecular (Hyperladder II, Bioline) e C⁻ é o controle negativo.

Após a separação por eletroforese dos “amplicons” obtidos por amplificação do cDNA da EPSPS-2 das populações B e B15 com os “primers” *EPS-1200*, estes foram sequenciados e as respectivas sequências foram alinhadas com sequências conhecidas de EPSPS de outras espécies (Quadro 4.6).

Pela análise das sequências obtidas (Quadro 10) podemos constatar que a população B15 não apresenta resistência por alterações ao nível do sítio alvo, ou seja, não apresenta substituição do aminoácido prolina da posição 106. Também não existe nenhuma mutação silenciosa, que neste caso seria a substituição da adenina por um dos outros três nucleótidos. Assim, podemos concluir que, no biótipo B15 de *C. canadensis* estudado, o mecanismo de resistência não se deve à insensibilidade da enzima EPSPS-2 ao glifosato, porque não foram detetadas mutações pontuais no fragmento do gene que codifica a EPSPS-2, responsáveis pela resistência àquele herbicida.

Quadro 10. Sequência de aminoácidos e nucleótidos correspondentes ao cDNA codificador da EPSPS-2, isolado a partir dos biótipos B e B15 e alinhado com as sequências conhecidas de outras espécies. Os alinhamentos foram efetuados com recurso à ferramenta bioinformática CLUSTALW, da “Kyoto University Bioinformatics Center” (anexo I).

Posição do aminoácido	101	102	106	144	196
Aminoácido	Gly	Thr	Pro	Gly	Ala
B	GGA	ACA	CCA	GGT	GCA
B15	GGA	ACA	CCA	GGT	GCA
<i>A. thaliana</i>	GGA	ACA	CCA	GGT	GCT
<i>Z. mays</i>	GGA	ACT	CCA	GGT	GCT
<i>S. halepense</i>	GGA	ACT	CCA	GGT	GCT
<i>E. indica</i>	GGA	ACT	CCA	GGT	GCT

O gene da EPSPS em plantas contém uma sequência codificante para um péptido de trânsito usado para direcionar a proteína para o cloroplasto, que é variável em sequência e comprimento, e é clivado quando alcança o cloroplasto, originando a proteína madura. Para consistência e facilidade de comparação, a maioria das numerações de aminoácidos publicadas não considera a sequência do péptido de trânsito (Sammons e Gaines, 2014).

As mutações da EPSPS que conferem resistência ao glifosato, em infestantes, referem-se à substituição da prolina da posição 106 por serina, treonina, alanina ou leucina (Sammons e Gaines, 2014). A prolina é codificada pelo codão CCx (x = A, T, C ou G); quando o primeiro nucleótido deste triplete é substituído por T, A, ou G, origina a serina (TCx), a treonina (ACx) ou a alanina (GCx), respetivamente. Por sua vez, a substituição do segundo nucleótido por uma timina resulta numa leucina (CTx).

Para além das quatro mutações (Pro106Ser/Thr/Ala/Leu) que conferem resistência em infestantes (Sammons e Gaines, 2014), outras mutações na EPSPS que conferem resistência ao glifosato foram identificadas através do uso da mutagenese dirigida e da expressão em *E. coli* e em plantas transgênicas. Estas mutações são a substituição da glicina da posição 101 por alanina (Gly101Ala), Thr102Ile, Pro106Ser/Thr/Gly/Cys/Ala/Ile/Val/Met/Leu, Gly144Asp/Asn e Ala192Thr. Segundo Sammons e Gaines (2014) e Powles e Yu (2010), estas mutações são passíveis de serem também identificadas em infestantes. Porém, nenhuma destas mutações se encontra presente nos indivíduos de *C. canadensis* em estudo, como mostra o alinhamento efetuado com outras espécies (Quadro 10). Ainda assim, existem mutações silenciosas nos nucleótidos correspondentes aos aminoácidos treonina 102 e alanina 196.

4.3. Ensaio de determinação da expressão génica

4.3.1. Ensaio de otimização

As condições de PCR em tempo real foram otimizadas apenas para o EF-1, uma vez que este era o único fragmento que, persistentemente, não amplificava. Testaram-se duas misturas de reação, a referir, 2x Máxima SYBR Green (Applied Biosystems) e 2x CFX Master Mix (Applied Biosystems) e a amplificação só ocorreu com a primeira, quando esta ainda tinha pouco tempo de utilização. O SYBR Green é sensível à luz, pelo que o seu manuseamento constante pode levar a alguma degradação. Ao contrário, o fragmento do gene da EPSPS-2 não apresentou dificuldades significativas em amplificar nas condições testadas.

As amostras não foram submetidas a tratamento com DNaseI, RNase free. Isto deveu-se ao facto de se terem observado grandes perdas de RNA durante o processo de purificação e precipitação após a digestão com DNaseI, RNase free. Possivelmente, a digestão com uma DNase em solução não foi a causa da perda do RNA. Os passos de purificação com clorofórmio e precipitação com etanol devem ter estado na base das perdas. Embora removesse os fragmentos de DNA indesejáveis, diminuiu a qualidade do RNA disponível para a síntese de cDNA e isto poderá afetar o posterior sucesso da amplificação por PCR. Na figura 9 observa-se que, para as mesmas condições, o sucesso da amplificação das amostras tratadas com DNase foi nulo. Sugere-se que numa próxima análise, após a digestão para remoção de DNA residual, sejam usadas colunas do tipo “RNeasy kits” ou “RNA clean-up” (Peters *et al.*, 2004).

As contaminações com DNA genómico podem causar grandes problemas especialmente quando o gene endógeno de referência se apresenta noutras formas (pseudogenes) ou quando a estrutura de intrões-exões do gene em estudo não é conhecida (Peters *et al.*, 2004). Sendo que o gene *epsps* está totalmente sequenciado, foi possível desenhar “primers” de modo a que a amplificação do cDNA gerasse um fragmento de 1200 pb e a amplificação do gDNA gerasse um fragmento de cerca de 7000 pb. Desta forma conseguiu-se evitar os efeitos da presença de contaminações genómicas com sucesso.

Depois de otimizar as condições, foram realizados ensaios preliminares em plantas não submetidas a AH e em plantas tratadas, às 24 e 48 horas AAH (Quadro 11). Devido à limitação do reagente SYBR Green disponível, nesta parte do trabalho foi feito apenas um ensaio para cada indivíduo, sem replicados. Neste passo, os RNAs de origem foram submetidos a tratamento com DNaseI, RNase free.

Quadro 11. Expressão relativa do gene *epsps-2* em tecidos de *C. canadensis* de um indivíduo suscetível e um resistente ao glifosato não submetidos a AH, e de indivíduos suscetíveis e resistentes 24 e 48 horas após serem submetidos a AH. Para cada um dos três casos, foram analisados indivíduos diferentes dentro da mesma população e os respectivos RNAs não foram tratados com DNase I, RNase free. C_T corresponde ao ciclo térmico.

		Sem aplicação		24 h		48 h	
		C _T	2 ^{-ΔΔCT}	C _T	2 ^{-ΔΔCT}	C _T	2 ^{-ΔΔCT}
suscetível	EPSPS-2	16,57	22,89	17,05	18,23		
	EF-1	31,99	29,95	23,53	23,20		
resistente	EPSPS-2	17,83	1,16	15,91	3,16	16,84	3,53
	EF-1	33,47	24,43	24,05	23,63		

4.3.2. Ensaios definitivos

Níveis de expressão da EPSPS-2 24 horas AAH

Uma vez otimizadas as condições de determinação da expressão génica, procedeu-se à análise dos níveis de expressão da EPSPS-2, de 3 indivíduos suscetíveis (S1, S2 e S3) e três indivíduos resistentes (R1, R2 e R3) ao glifosato, 24 horas AAH. Analisou-se também a expressão de um indivíduo suscetível (S4) e um resistente (R4), não submetidos a AH.

Ensaio 1

Numa primeira abordagem utilizou-se um segundo gene de referência, o *18S*. Este gene codifica para o RNA ribossomal que constitui a subunidade pequena (18 unidades Svedberg) do ribossoma de eucariotas (Meyer *et al.*, 2010). De forma a providenciar uma análise detalhada da expressão do gene *epsps-2* em plantas infestantes, antes e depois da aplicação do herbicida glifosato, foi necessário ter uma ideia da estabilidade de diferentes genes de referência. Em *C. canadensis*, somente o gene *ef1-α* foi reportado (Dinelli *et al.*, 2006) e nenhum estudo fornece informação apropriada sobre genes de referência em *Conyza*. Os níveis de expressão dos genes de referência devem manter-se constantes entre diferentes tecidos e/ou em resposta a diferentes estímulos exteriores. Contudo, há muitos genes usados como “housekeeping genes” que, em muitos estudos, já mostraram não ser estáveis (Gutierrez *et al.*, 2008).

O cálculo do desvio padrão relativo da repetibilidade do gene *18S* (Quadro 12) resultou numa variação de 1,6 unidades entre a população S e a população R, sendo este gene aquele que apresenta maior diferença entre populações (o *epsps-2* e o *ef1-α* apresentaram ambos uma variação de 1,1 unidades). Assim, para o ensaio 2 optou-se pela utilização do *ef1-α* como gene de referência. Além

disso, o *18S* apresentou uma variação oposta em relação aos valores obtidos para o gene *epsps-2*, ou seja, apresentou níveis superiores na população S relativamente à população R.

Quadro 12. Expressão relativa do gene *epsps-2* em tecidos (folhas) de *C. canadensis* de três indivíduos suscetíveis (S1, S2 e S3) e três indivíduos resistentes (R1, R2 e R3), 24 horas AAH. Os valores correspondem às médias e desvios padrão dos C_T (ciclo “Threshold”) de cada conjunto de três replicados.

	C_T		
	EPS-180	EF-1	18S
S1	18,45 ($\pm 0,042$)	25,15 ($\pm 0,179$)	16,89 ($\pm 0,025$)
S2	19,36 ($\pm 0,206$)	27,60 ($\pm 0,563$)	18,24 ($\pm 0,141$)
S3	19,16 ($\pm 0,212$)	27,33 ($\pm 0,514$)	17,88 ($\pm 0,261$)
R1	18,94 ($\pm 0,142$)	25,90 ($\pm 0,269$)	19,06 ($\pm 0,289$)
R2	20,36 ($\pm 0,250$)	27,95 ($\pm 0,307$)	18,35 ($\pm 0,244$)
R3	19,55 ($\pm 0,139$)	27,46 ($\pm 0,071$)	18,27 ($\pm 0,413$)

Através do teste de Shapiro-Wilk verificou-se que os valores de ΔC_T seguem uma distribuição normal ($p\text{-value} > 0,05$) em todos os casos. Através da ANOVA (fator único) pode-se constatar que não há diferenças significativas na expressão relativa do gene codificador da EPSPS-2 dentro da mesma população, quando o gene de referência é o *ef1- α* ; contudo, no caso do gene de referência ser o *18S*, rejeita-se a hipótese dos indivíduos da população suscetível (S) apresentarem níveis de expressão do *epsps-2* idênticos ($p\text{-value} \approx 0,12 > 0,05$) (Quadro 13).

A ANOVA é realizada com os valores de ΔC_T ao invés dos valores de C_T , pois os valores de C_T são bastante afetados por variações na concentração inicial dos cDNAs, resultantes da imprecisão do equipamento medidor (Nanodrop), da presença dos primers “random” e específico do gene, de “primer-dimer”, etc., bem como do processo de pipetagem; como os valores de ΔC_T são valores relativos, em parte anulam estes erros, sobretudo os associados à concentração inicial de cDNA.

Para utilizar o teste t de *student* na análise dos dados da PCR em tempo real, assume-se que o efeito aditivo da concentração do gene e do replicado pode ser ajustado subtraindo o valor de C_T do gene de referência ao valor de C_T do gene alvo. O valor de ΔC_T poderá então ser submetido ao teste t, o qual irá fornecer uma estimativa do valor de $\Delta \Delta C_T$. Como alternativa não paramétrica ao teste t, poder-se-ia recorrer ao teste de Wilcoxon com dois grupos. Para tal, assume-se que ambos os grupos de ΔC_T apresentam distribuições de Gauss e variâncias iguais. Contudo, estes pressupostos poderão não ser válidos em estudos de PCR em tempo real com amostras pequenas. Uma alternativa é o teste não paramétrico de Wilcoxon que, neste caso, será mais apropriado e robusto (Yuan *et al.*, 2006).

Quadro 13. Valores calculados de ΔC_T (variação do ciclo térmico) e $2^{-\Delta\Delta C_T}$ relativos à expressão gênica relativa da EPSPS-2 em tecidos de *C. canadensis* de três indivíduos suscetíveis (S1, S2 e S3) e três indivíduos resistentes (R1, R2 e R3), 24 horas AAH. O valor de $\Delta\Delta C_T$ foi calculado a partir das médias dos ΔC_T dos indivíduos suscetíveis e dos resistentes.

	EF-1			18S		
	ΔC_T	Média ΔC_T	$2^{-\Delta\Delta C_T}$	ΔC_T	Média ΔC_T	$2^{-\Delta\Delta C_T}$
S1	-6,70	-7,71 ($\pm 0,503$)	0,86	1,57	1,32 ($\pm 0,132$)	1,20
S2	-8,24			1,12		
S3	-8,17			1,28		
R1	-6,96	-7,49 ($\pm 0,281$)		-0,12	1,06 ($\pm 0,625$)	
R2	-7,59			2,01		
R3	-7,91			1,28		
	S	R		S	R	
<i>p-value</i>	0,0217	0,0121		0,0057	0,0269	

Ensaio 2

Novamente, através do teste de Shapiro-Wilk verificou-se que os valores de ΔC_T seguem uma distribuição normal ($p\text{-value} > 0,05$) em todos os casos. A ANOVA (fator único) mostrou não haver diferenças significativas na expressão relativa do gene codificador da EPSPS-2 dentro da mesma população. Através do teste t de *student*, inferiu-se que, em ambos os casos, não existem diferenças significativas nos níveis de expressão do gene da EPSPS-2 entre os indivíduos suscetíveis e resistentes, 24 horas AAH, dado que os valores de prova obtidos tanto para o ensaio 1 (0,72 para o *ef1- α* e 0,70 para o *18S*) como para o ensaio 2 (0,71) foram superiores ao nível de significância assumido ($\alpha = 0,05$). Estes resultados sugerem que a sobre-expressão do gene codificador da EPSPS-2 não constitui um mecanismo de resistência ao glifosato na população em estudo (Quadro 14).

Quadro 14. Expressão relativa do gene *epsps-2* e valores calculados de ΔC_T (variação do ciclo térmico) e $2^{-\Delta\Delta C_T}$ para tecidos (folhas) de *C. canadensis* de quatro indivíduos suscetíveis (S1, S2, S3 e S4) e quatro indivíduos resistentes (R1, R2, R3 e R4), 24 horas AAH, e sem aplicação (SH). Os valores correspondem às médias e desvios padrão dos C_T de cada conjunto de três replicados.

		EPS-1200	EF-1	ΔC_T	Média ΔC_T	$2^{-\Delta\Delta C_T}$
24 h AAH	S1	22,05 ($\pm 0,225$)	26,85 ($\pm 0,292$)	-4,80	-5,33 ($\pm 0,338$)	1,17
	S2	22,60 ($\pm 0,365$)	28,56 ($\pm 0,060$)	-5,96		
	S3	22,54 ($\pm 0,327$)	27,77 ($\pm 0,270$)	-5,22		
	R1	22,16 ($\pm 0,387$)	26,96 ($\pm 0,278$)	-4,80	-5,56 ($\pm 0,478$)	30,27
	R2	22,99 ($\pm 0,095$)	29,43 ($\pm 0,075$)	-6,44		
	R3	22,88 ($\pm 0,327$)	28,31 ($\pm 0,072$)	-5,44		
SH	S4	20,64 ($\pm 0,127$)	22,37 ($\pm 0,115$)		-1,73	30,27
	R4	20,13 ($\pm 0,199$)	26,78 ($\pm 0,330$)		-6,65	
		S (CH)		R (CH)		
<i>p-value</i>		0,0145		0,0206		

A análise das curvas de “melting” é um método usado para avaliar a extensão de potenciais ligações não específicas do corante (neste caso, o SYBR Green) a qualquer produto de dupla cadeia de cDNA, incluindo dímeros de “primers” e produtos de amplificação inespecíficos. Os dímeros de “primers” são produtos inespecíficos do “annealing” e da extensão que competem com a síntese do produto específico da PCR, reduzindo a eficiência da amplificação (Morrison *et al.*, 1998) (Anexo VI). Estas curvas representam a temperatura necessária para a desnaturação dos “amplicons” produzidos, altura em que, por separação das cadeias, toda a fluorescência que se encontrava intercalada é libertada. A temperatura de “melting” depende do tamanho e composição em bases do produto amplificado. Normalmente, o valor real obtém-se através de aumentos de 1 °C, sucessivos, da temperatura nos tubos da reação até se libertar toda a fluorescência intercalada nos “amplicons” (Mackay *et al.*, 2007). Quando os produtos da PCR são puros e homogêneos, originam uma curva de “melting” única e bem definida, com um pico estreito (Pfaffl, 2004). Foi este o método utilizado para se obter as curvas de “melting” correspondentes aos ensaios anteriores (anexo V) e que confirmaram a existência de um só “amplicon”.

Além disto, procedeu-se a mais uma confirmação de que fragmentos amplificados correspondiam aos previstos para cada par de “primers”, correndo-se alguns dos produtos da PCR em gel de agarose, tendo-se obtido os resultados esperados (Fig. 11).

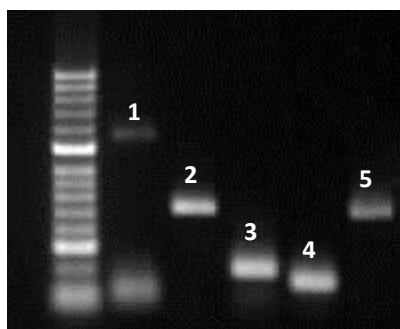


Figura 11. Perfil eletroforético correspondente aos fragmentos de cDNA amplificados por PCR em tempo real. 1 e 2 correspondem aos produtos da segunda reação da PCR em tempo real (ensaio 2) usando os “primers” *EPS-1200* e *EF-1*, respetivamente, e 3, 4 e 5 correspondem aos produtos da primeira reação, usando os “primers” *EPS-180*, *18S* e *EF-1*, respetivamente.

A principal lacuna da abordagem relativa deve-se ao facto da expressão da maioria dos genes de referência poder ser regulada pelos fatores de stresse em estudo e, conseqüentemente, os níveis poderem variar significativamente após tratamentos (ex. herbicida) (Pfaffl, 2004). Isto pode estar na base da variabilidade dos genes em estudo (Quadro 15).

Quadro 15. Variância das médias dos C_T dos indivíduos suscetíveis S1, S2 E S3 (S), e dos indivíduos resistentes R1, R2 E R3 (R), correspondentes aos “primers” usados nos ensaios 1 e 2.

	Ensaio 1			Ensaio 2	
	EPS-180	EF-1	18S	EPS-1200	EF-1
S	0,225	1,798	0,490	0,092	0,729
R	0,508	1,149	0,191	0,201	1,530
Média	0,367	1,474	0,340	0,146	1,130

Sendo o *ef1-α* um gene endógeno, as médias dos respetivos C_T deveriam apresentar uma variância baixa. Contudo, este foi o gene que apresentou maior variabilidade nos dois ensaios (Quadro 15). Sendo a quantidade inicial de cDNA igual em todas as amostras (150 ng), era espectável que os valores de C_T relativos ao *ef1-α* fossem idênticos e que a variabilidade apenas se verificasse para o gene *epsps-2*, no caso de haver diferenças na expressão. Porém, verificou-se o oposto, ou seja, uma diferença de 0,51 ciclos entre S4 e R4 usando os “primers” *EPS-1200*, e 4,41 ciclos usando os “primers” *EF-1*. Assim, dado que se trata de um método comparativo, foi a variabilidade do *ef-1* que deu origem a um valor de $2^{-\Delta\Delta C_T} = 30,27$ nas plantas não submetidas aplicação de glifosato.

Também se observaram diferenças na variância dos C_T relativos aos “primers” *EPS-180* e *EPS-1200* (Quadro 15). Como foi dito atrás, os “primers” *EPS-180*, além de cDNA, também podem amplificar DNA genómico que poderia eventualmente existir nas amostras em maior ou menor quantidade e,

assim, originar esta diferença. Contudo, isto não alterou significativamente os valores de $2^{-\Delta\Delta CT}$ obtidos no ensaio 1 e 2 (1,20 e 1,17, respetivamente), para as 24 horas AAH, o que revela que o processo de extração de RNA utilizado neste estudo não permite a co-extração de DNA.

IV – Conclusões

O ensaio de determinação de shiquimato em discos de folhas confirmou a presença de resistência ao glifosato na população B15. Os resultados mostraram que há uma taxa de acumulação de shiquimato de cerca de 20 a 21 vezes superior no biótipo B (suscetível), relativamente ao biótipo B15 (resistente).

A sequenciação do gene codificador da EPSPS-2 mostrou que não existe substituição do aminoácido prolina 106, a qual é responsável pela insensibilidade da enzima ao glifosato. Outras possíveis mutações, observadas em estudos de mutagénese dirigida e de expressão em *E. coli* e em plantas transgênicas também foram analisadas, não tendo sido igualmente observadas alterações.

O estudo da expressão do gene codificador da EPSPS-2, relativamente aos genes de referência (endógenos) *ef1-α* e *18S*, não revelou diferenças na expressão deste gene nas duas populações, 24 horas AAH. Além disto, os níveis de transcritos deste gene apresentaram uma variabilidade reduzida, podendo-se afirmar que o gene codificador da EPSPS-2 se comportou como um gene endógeno.

Em suma, a população B15 apresenta resistência ao glifosato por um mecanismo que não envolve mutações no gene codificador da EPSPS-2 nem a sua sobre-expressão.

Referências bibliográficas

- Ahn, SJ; Costa, J; Emanuel, JR; PicoGreen quantitation of DNA: effective evaluation of samples pre- or post-PCR. *Nucleic Acids Research*, 24:2623–2625, 1996.
- Amaro, PA. Proteção Integrada. p123-124, 2003.
- Andersen, MC. Diaspore morphology and seed dispersal in several winddispersed *Asteraceae*. *American Journal of Botany*, 80(5):487-492, 1993.
- Baerson, SR; Rodriguez, DJ; Tran, M; Feng, Y; Biest, NA; Dill, JM. Glyphosate-Resistant Goosegrass. Identification of a Mutation in the Target Enzyme 5-Enolpyruvylshikimate-3-Phosphate Synthase. *Plant Physiology*, 129:1265-1275, 2002.
- Beckie, HJ; Heap, IM; Smeda, RJ; Hall, LM. Screening for herbicide resistance in weeds. *Weed Technology*, 14:428–445, 2000.
- Ben-Ami, G; Whitefish, T; Sibony, M; Rubin, B. Glyphosate resistance in *Conyza species* is dependent on environmental conditions. 2007.
- Bianchi, MA; Vargas, L; Rizzardi, MA. Manejo e controle de plantas daninhas resistentes ao glifosato no Brasil. In: Karam, D; Mascarenhas, MHT; e Silva, JB. *A Ciência das Plantas Daninhas na Sustentabilidade dos Sistemas Agrícolas*. Sete Lagoas, MG: SBCPD - EMBRAPA Milho e Sorgo, 1:223-231, 2008.
- Bhowmik, PC; Bekech, NN. Horseweed (*Conyza canadensis*) seed production, emergence, and distribution in no-till and conventional tillage corn (*Zea mays*). *Agronomy (Trends in Agricultural Sciences)*, 1(2):67-71, 1993.
- Boutsalis, P. Syngenta quick test: a rapid whole-plant test for herbicide resistance. *Weed Technology*, 15: 257-263, 2001.
- Bresnahan, GA; Manthey, FA; Howatt, KA; Chakraborty, M. Glyphosate applied pre harvest induces shikimic acid accumulation in hard red spring wheat (*Triticum aestivum*). *Journal of Agriculture and Food and Chemistry*, Easton, 51: 4004-4007, 2003.
- Brown, TA. Gene Cloning and DNA Analysis: An Introduction. Wiley-Blackwell, 6th ed., p153-162, 2010.
- Bruce, JA; Kells, JJ. Horseweed (*Conyza canadensis*) control in no-tillage soybeans (*Glycine max*) with preplant and preemergence herbicides. *Weed Technology*, Lawrence, 4(5):642-647, 1990.
- Busi, R; Powles, SB. Evolution of glyphosate resistance in a *Lolium rigidum* population by glyphosate selection at sublethal doses. *Heredity*, 103:318-325, 2009.
- Calha, IM. Mecanismos de resistência a herbicidas e resistências cruzadas. INRB, I.P./L-INIA, Unidade de Investigação de Proteção de Plantas, 2011.
- Calha, I; Moreira, I; Rocha, F. Germinação de sementes de populações de orelha-de-mula (*Alisma plantago-aquatica*) resistentes e susceptíveis ao bensulfurão-metilo. *Revista de Ciências Agrárias*, 2007.
- Calha, I; Osuna, D. Herbicide Weed Resistance in Portuguese Olive Groves. *AFPP Conference – International Meeting On Weed Control*, Dijon, p1-5, 2010.
- Calha, I; Portugal, J. Glyphosate resistance in Portugal: status and potential solutions. *Glyphosate Weed Resistance – European Status & Solutions*. Córdoba, p27-28, 2012.

- Cardinali, VCB; Dias, ACR; Campana, FB; Figueira, A; Stewart, CN; Good, L; Christoffoleti, PJ. Análise da expressão gênica da enzima EPSPS em *Conyza bonariensis* resistente ao glyphosate. *XXVII Congresso Brasileiro da Ciência das Plantas Daninhas*, 2010.
- CE (Comissão Europeia), 2009. Diretiva 2009/128/CE – Quadro de ação a nível comunitário para uma utilização sustentável dos pesticidas. Disponível em: www.scribd.com/doc/63083921/Directiva-2009-128-CE-sobre-o-uso-sustentavel-de-pesticidas. Consultado em: 18/07/2014.
- Chauvel, B; Guillemin, JP; Colbach, N. Evolution of a herbicide-resistant population of *Alopecurus myosuroides* Huds. in a long-term cropping system experiment. *Crop Protection*, 28:343-349, 2009.
- Christoffoleti, PJ; Filho, RV; Silva, CB. Resistência de plantas daninhas aos herbicidas. *Planta Daninha*, 12(1), 1994.
- Christoffoleti, PJ; Medeiros, D; Monqueiro, PA; Passini, T. Plantas daninhas à cultura da soja: controle químico e resistência a herbicidas. Piracicaba: ESALQ, p179-202, 2000.
- Christoffoleti, PJ. Aspectos de resistência de plantas daninhas a herbicidas. 2 ed. Campinas: Associação Brasileira de Ação a resistência de Plantas aos herbicidas (HRAC), p27-28, 2004.
- Christoffoleti, PJ; López-Ovejero, RF. Resistência das plantas daninhas a herbicidas: definições, bases e situação no Brasil e no mundo. In: Christoffoleti, PJ. Aspectos de resistência de plantas daninhas a herbicidas. 3. ed. Campinas: HRAC-BR, p9-34, 2008.
- Coleman, WB; Tsongalis, GJ. The Polymerase Chain Reaction. *Molecular Diagnostics*, p47-55, 2005.
- Coupland, D; Peabody, DV. Absorption, translocation, and exudation of Glyphosate, Fosamine and Amitrole in Field Horsetail (*Equisetum arvense*). *Weed Science*, 29:556-60, 1981.
- Cromartie, TH; Polge, ND. An improved assay for shikimic acid and its use as monitor for the activity of sulfosate. *Proceedings of the Weed Science Society of America*, 40:291, 2000.
- Cruz, FS. Confirmação de resistência ao glifosato em *Conyza canadensis*. Dissertação para a obtenção do Grau de Mestre em Engenharia Agrônoma (Proteção de Plantas), ISA, 2013.
- Culpepper, AS; Grey, TL; Vencil, WK; Kichler, JM; Webster, TM; Brown, SM; York, AC; Davis, JW; Hanna, WW. Glyphosate-resistant Palmer amaranth (*Amaranthus palmeri*) confirmed in Georgia. *Weed Science*, 54:620-626, 2006.
- Dauer, JT; Mortensen, DA; Vangessel, MJ. Temporal and spatial dynamics of long-distance *Conyza canadensis* seed dispersal. *Journal of Applied Ecology*, 44(1):105-114, 2007.
- Délye, C; Jasieniuk, M; Le Corre, V. Deciphering the evolution of herbicide resistance in weeds. *Trends in Genetics*, p1-10, 2013.
- Desroche, N; Beltramo, C; Guzzo, J. Determination of an internal control to apply reverse transcription quantitative PCR to study stress response in the lactic acid bacterium *Oenococcus oeni*. *J. Microbiol. Methods*, 60:325-333, 2005.
- Dick, RE; Quinn, JP. Glyphosate-degrading isolates from environmental samples: occurrence and pathways of degradation. *Applied Microbiology Biotechnology*, 43:545-550, 1995.

- Dinelli, G; Marotti, I; Bonetti, A; Minelli, M; Catizone, P; Barnes, J. Physiological and molecular insight on the mechanisms of resistance to glyphosate in *Conyza canadensis* (L.) Cronq. biotypes. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 86:30–41, 2006
- Duke, SO; Powles, SB. Glyphosate: a once-in-a-century herbicide. *Pest Manag Sci*, 64(4):319-25, 2008.
- Duke, SO. Glyphosate degradation in glyphosate-resistant and -susceptible crops and weeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(11):5835-5841, 2011.
- Feng, JC; Thompson, DG; Reynolds, PE. Fate of glyphosate in a Canadian forest watershed: 1. Aquatic residues and off-target deposit assessment. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 38:1110-1118, 1990.
- Feng, PCC; Tran, M; Chiu, T; Sammons, RD; Heck, GR; Jacob, CA. Investigations into glyphosate-resistant horseweed (*Conyza canadensis*): retention, uptake, translocation, and metabolism. *Weed Science*, 52:498-505, 2004.
- Feng, PCC; Jacob, CA; Martino-Catt, SJ; Cerny, RE; Elmore, GA; Heck, GR; Huang, J; Kruger, WM; Malven, M; Miklos, JA; Padgett, SR. Glyphosate-Resistant Crops: Developing the next Generation Products. *Glyphosate Resistance in Crops & Weeds – History, Development & Management*. John Wiley, Nova Iorque, p45-61, 2010.
- Fontes, JRA; Shiratsuchi, LS; Neves, JL; Júlio, L; Filho, JS. Manejo Integrado de Plantas Daninhas. Embrapa, 2003.
- Franco, JA. Nova Flora de Portugal (Continente e Açores). Vol. II, Lisboa. 1984
- Gaines, TA; Zhang, W; Wang, D; Bukuna, B; Chisholm, ST; Shaner, DL; Nissen, SJ; Patzoldt, WL; Tranel, PJ; Culpepper, AS; Grey, TL; Webster, TM; Vencill, WK; Sammons, RD; Jiang, J; Preston, C; Leach, JE; Westra, P. Gene amplification confers glyphosate resistance in *Amaranthus palmeri*. *PNAS*, 107(3):1029-1034, 2010.
- Gaines, TA; Wright, AA; Molin, WT; Lorentz, L; Riggins, CW. Identification of Genetic Elements Associated with EPSPS Gene Amplification. *PLOS ONE*, 8(6):65819, 2013.
- Galli, AJB; Montezuma, MC. Glifosato: Alguns aspectos da utilização do Herbicida Glifosato na Agricultura. ACADCOM, 2005.
- Gasquez, J. Genetics of herbicide resistance within weeds. Factors of evolution, inheritance and fitness. In: De Prado, R; Jorrín, J; García-Torres, L; (eds) *Weed and crop resistance to herbicides*. Kluwer, Dordrecht, p181-189, 1997.
- Ge, X; d'Avignon, DA; Ackerman, JJH; Sammons, RD. Rapid vacuolar sequestration: the horseweed glyphosate resistance mechanism. *Pest Manag Sci*; 66:345–348, 2010
- Ge, X; d'Avignon, DA; Ackerman, JJH; Duncan, B; Spaurd, MB; Sammons, RD. Glyphosate-resistant horseweed made sensitive to glyphosate: low-temperature suppression of glyphosate vacuolar sequestration revealed by ³¹P NMR. *Pest Manag Sci*; 67:1215-1221, 2011.
- Giesy, JP; Dobson, S; Solomon, KR. Ecotoxicological Risk Assessment for Roundup Herbicide. *Rev. Environment Contamination Toxicology*, Nova York, 167:35-120, 2000.
- Goldsborough, LG; Brown, DJ. Dissipation of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in water and sediments of boreal forest ponds. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 12:1139-1147, 1993.

- González-Torralva, F; Cruz-Hipolito, H; Bastida, F; Mülleder, N; Smeda, RJ; De Prado, R. Differential Susceptibility to Glyphosate among the *Conyza* Weed Species in Spain. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58:4361-4366, 2010.
- Gressel, J. Why get resistance? It can be prevented or delayed. In: Caseley, JC; Cussans, GW; Atkin, RK. *Herbicide Resistance in Weeds and Crops*. Oxford: Butterworth-Heinemann, p1-25, 1991.
- Gutierrez, L; Mauriat, M; Guenin, S; Pelloux, J; Lefebvre, JF. *et al.* The lack of a systematic validation of reference genes: a serious pitfall undervalued in reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis in plants. *Plant Biotechnology Journal*, 6:609–618, 2008.
- Hager, A; Sprague, C. *Illinois Agricultural Pest Management Handbook*, 19, 2000.
- Hall, LM; Tardif, FJ; Powles, SB. Mechanisms of cross and multiple herbicide resistance in *Alopecurus myosuroides* and *Lolium rigidum*. *Phytoprotection*, 75(4):17-23, 1994.
- Heap, IA. Criteria for confirmation of the herbicide-resistant weeds. International Survey of Herbicide-Resistant Weeds. 2005.
- Heap, I. Top 10 worst herbicide resistant weeds globally. 51st *Meeting of the Weed Science Society of America*, p319, 2011.
- Heap, IM. International survey of herbicide resistant weeds. 2014. Disponível na internet em <http://www.weedscience.org>, acesso em 1 de Agosto de 2014.
- Heck, GR; *et al.* Investigations into glyphosate resistant horseweed (*Conyza canadensis*): EPSPS gene family. 2004.
- Hill, PJ; Stewart, GSAB. The polimerase chain reaction in molecular and micro-biology. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, 10, 1992.
- Holt, J. Fitness and ecological adaptability of herbicide resistant biotypes. In: Green, MB; LeBaron, HL; Moberg, WK. *Managing Resistance to Agrochemicals: from Fundamental Research to Practical Strategies*. Washington: American Chemical Society, p419-429, 1990.
- Holt, JS; Powles, SB; Holtum, JAM. Mechanisms and agronomic aspects of herbicide resistance. *Annu. Rev. Plant Physiol. Mol. Biol.*, 44:203-229, 1993.
- Holm, L; Doll, J; Holm, E; Pancho, J; Herberger, J. *World Weeds. Natural Histories and Distribution*. New York, USA: John Wiley & Sons, p1129, 1997.
- Inácio, EM; Monquero, PA. Controle químico e caracterização da superfície foliar de *Conyza bonariensis* e *C. canadensis* (Asteraceae). *Revista Brasileira de Herbicidas*, 12(3):220-231, 2013.
- Innan, H; Kondrashov, F. The evolution of gene duplications: classifying and distinguishing between models. *Nat. Rev. Gen.*, 11:97-108, 2010.
- Jablonkai, I. Molecular Mechanism of Action of Herbicides. In: Hasaneen, MN. *Herbicides - Mechanisms and Mode of Action. InTech*, p4, 2011.
- Jakelaits, A; Ferreira, LR; Silva, AA. Manejo integrado de tiririca (*Cyperus rotundus* L.) em culturas de milho e feijão em sistema de sementeira convencional e direto. In: Zambolim, L. *Manejo Integrado Fitossanidade: Cultivo Protegido, Pivô-Central e Sementeira Direta*. Viçosa, MG: Editora UFV, p722, 2001.

- Jander, G; Baerson, SR; Hudak, JA; Gonzalez, KA; Gruys, KJ; Last, RL. Ethylmethanesulfonate saturation mutagenesis in Arabidopsis to determine frequency of herbicide resistance. *Plant Physiology*, 131:139–146, 2003.
- Jasieniuk, M; Brule-Babel, AL; Morrison, IN. The evolution and genetics of herbicide resistance. *Weed Sci.*, 44:176–193, 1996.
- Kissmann, KG; Groth, D. *Plantas Infestantes e Nocivas*. 2ª edição, v. II. São Paulo, SP: BASF, p978, 1999.
- Kissmann, KG. Resistência de plantas daninhas a herbicidas. 2003.
- Klein, D. Quantification using real-time PCR technology: applications and limitations. *Trends in Molecular Medicine*, 8(6):257-60, 2002.
- Koger, C.H.; Poston, D.H.; Hayes, R.M. & Montgomery, R.F., Glyphosate resistant horseweed (*Conyza canadensis*) in Mississippi. *Weed Technology*, 18(3):820-825, 2004.
- Koger, CH; Reddy, KN. Role of absorption and translocation in the mechanism of glyphosate resistance in horseweed (*Conyza canadensis*). *Weed Science*, 53:84–89, 2005.
- Kollman, W; Segawa, R. *Interim Report Of The Pesticide Chemistry Database: Environmental Hazards Assessment Program*. Department of Pesticide Regulation, 1995.
- Lanzetta, PA; Alvarez, LJ; Reinach, PS; Candia, OA. An improved assay for nanomole amounts of inorganic phosphate. *Analytical Biochemistry*, 100:95-97, 1979.
- Lebrun, M; Freyssinet, M; Sailland, A; Rolland, A; Freyssinet, G. Molecular basis of resistance to shikimic herbicides in adapted maize cell cultures, 2005.
- Lehninger, AL; Nelson, DL; Cox, MM. Principles of Biochemistry. W.H. Freeman and Company, New York, 4th edition, 2005.
- Lorenzi, H. Plantas Daninhas do Brasil. Terrestres, Aquáticas, Parasitas e Tóxicas. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, p608, 2000.
- Leroux, GD; Bernoit, DL; Banville, S. Effect of crop rotations on weed control, *Bidens cernua* and *Erigeron canadensis* populations, and carrot yields in organic soils. *Crop Protection*, Oxford, 15(2):171-178, 1996.
- Ma, H; Shieh, KJ; Chen, G; Qiao, T; Chuang, MY. Application of Real-time Polymerase Chain Reaction (RT-PCR). *The Journal of American Science*, 2:1-15, 2006.
- Mackay, IM, Mackay, JF, Nissen, MD, Sloots, TP. Real-time PCR: History and Fluorogenic Chemistries. in Mackay, 1-40, I.M. (Ed.), *Real-Time PCR in Microbiology, From Diagnosis to Characterization*. Caister Academic Press Norfolk, UK, 2007.
- Maeda, H; Dudareva, N. The Shikimate Pathway and Aromatic Amino Acid Biosynthesis in *Plants*. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 63:73-105, 2012.
- Mangolin, CA; Oliveira Jr, RS; Machado, MFPS. Genetic diversity in weeds. In: Fernandez, R.A. (Ed.), *Herbicides - Environmental Impact Studies and Management Approaches*. Rijeka, Croatia: *Intech*, 223-248, 2012.
- Morrison, TB; Weis, JJ; Wittwer, CT. Quantification of low-copy transcripts by continuous SYBR Green I monitoring during amplification. *Biotechniques*, 24(6): 954-962, 1998.
- Mendes, SPC. Resistência ao glifosato em populações de *Conyza canadensis* L. no Alentejo. Instituto Politécnico de Beja – Escola Superior Agrária, 2011.

- Mendes, S; Portugal, J; Calha, I. Prospecção de resistência ao glifosato em populações de *Conyza canadensis*. *Revista de Ciências Agrárias*, 35(36):322-328, 2012.
- Mensink, H; Janssen, P. Glyphosate World Health Organization. Geneva, 1994.
- Meyer, A; Todt, C; Mikkelsen, NT; Lieb, B. Fast evolving 18S rRNA sequences from Solenogastres (*Mollusca*) resist standard PCR amplification and give new insights into mollusk substitution rate heterogeneity. *Evolutionary Biology*, 10:70, 2010.
- Monsanto, Roundup® Ultra – Ficha de Dados de Segurança. 2010. Disponível em: http://www.bayercropscience.pt/internet/images/produtos/prod_file2_70.pdf. Consultado em: 2014/07/10.
- Mueller, TC; Massey, JH; Hayes, RM; Main, CL; Stewart. Shikimate accumulates in both glyphosate sensitive and glyphosate resistant horseweed (*Conyza Canadensis* L.). *J. Agric. Food Chem*, 51:680–684, 2003.
- Nandula, VK; Eubank, TW; Poston, DH; Koger, CH; Reddy, KN. Factors affecting germination of horseweed (*Conyza canadensis*). *Weed Science*, 54(5):898-902, 2006.
- Nandula, VK. Glyphosate Resistance in Crops & Weeds – History, Development & Management. John Wiley, Nova Iorque, p35-42, 2010.
- Neto, AMO; Constantin, J; Oliveira Jr, RS; Guerra, N; Dan, HA; Alonso, DG; Blainski, E; Santos, G. Estratégias de manejo de inverno e verão visando ao controle de *Conyza bonariensis* e *Bidens pilosa*. *Planta Daninha*, Viçosa-MG, 28:1107-1116, 2010.
- Neve, P; Diggle, AJ; Smith, FP; Powles, SB. Simulating evolution of glyphosate resistance in *Lolium rigidum* II: past, present and future glyphosate use in Australian cropping. *Weed Research*, 43:418–427, 2003.
- Neve, P; Vila-Aiub, M; Roux, F. Evolutionary-thinking in agricultural weed management. *New Phytologist*, 184:783–793, 2009.
- Neve, P; Norsworthy, JK; Smith, KL; Zelaya, IA. Modelling evolution and management of glyphosate resistance in *Amaranthus palmeri*. *Weed Res.*, 51:99–112, 2011.
- Nol, N; Tsikou, D; Eid, M; Livieratos, IC; Giannopolitis, CN. Shikimate leaf disc assay for early detection of glyphosate resistance in *Conyza canadensis* and relative transcript levels of EPSPS and ABC transporter genes. *Weed Research*, 52:233–241, 2012.
- Norsworthy, JK; Ward, SM; Shaw, DR; Llewellyn, RS; Nichols, RL; Webster, TM. Reducing the Risks of Herbicide Resistance: Best Management Practices and Recommendations. *Weed Science*, Special Issue:31–62, 2012.
- Ng, CH; Wickneswari, R; Salmijah, S; Teng, YT; Ismail, BS. Gene polymorphisms in glyphosate-resistant and -susceptible biotypes of *Eleusine indica* from Malaysia. *European Weed Research Society*, 43:108–115, 2003.
- Olsvik, PA; Lie, KK; Jordal, AEO; Nilsen, RO; Hordvik, I. Evaluation of potential reference genes in real-time RT-PCR studies of Atlantic salmon. *BMC Mol. Biol.*, 6:21, 2005.
- Padgett, SR; Re, DB; Barry, GF; Eichholtz, DE; Delannay, X; Fuchs, RL; Kishore, GM; Fraley, RT. New weed control opportunities: development of soybeans with a Roundup Ready gene. In: Duke, S (ed.). *Herbicide*

- Resistant Crops: Agricultural, Economic, Environmental, Regulatory, and Technological Aspects*. CRC Press, Boca Raton, FL, p53–84, 1996.
- Parrot, F; Bedry, MDR; Garrigues, JCF. Glyphosate Herbicide Poisoning: Use of a Routine Aminoacid Analyzer Appears to be a Rapid Method for Determining Glyphosate and Its Metabolite in Biological Fluids. *Clinical Toxicology*, 33(6):695-698, 1995.
- Pelt-Verkuil, E; van Belkum, A; Hays, JP. Principles and technical aspects of PCR amplification, Springer, p332, 2008.
- Peters, IR; Helps, CR; Hall, RJ; Day, MJ. Real-time RT-PCR: considerations for efficient and sensitive assay design. *Journal of Immunological Methods*, 286:203–217, 2004.
- Pfaffl, MW. Quantification strategies in real-time PCR. 3:87-112. in: *A-Z of quantitative PCR*. S.A. Bustin, 2004.
- Pfaffl, MW. Relative quantification. In: Dorak, T. *Real-time PCR*. International University Line, p63-82, 2007.
- Powles, SB; Yu, Q. Evolution in action: plants resistant to herbicides. *Annu. Rev. Plant Biol*, 61:317–47, 2010.
- Perez, A; Kogan, M. Glyphosate-resistant *Lolium multiflorum* in Chilean orchards. *Weed Research*, Lawrence, 43:12–19, 2003.
- Perez-Jones, A; Mallory-Smith, C. Biochemical mechanisms and molecular basis of evolved glyphosate resistance in weed species. In: Nandula, VK. *Glyphosate resistance in crops and weeds: history, development and management*, 2010.
- Pitelli, RA; Durigan, JC. Ecologia de plantas daninhas no sistema de sementeira direto. In: Rossello, RD (Ed.), *Siembra Directa en el Cono Sur*. Montevideo, Uruguay: IICA, 1ª edição, p203-210, 2001.
- Prata, F; Lavorenti, A; Regitano, JB; Tornisielo, VL. Influência da matéria orgânica na sorção e desorção do glifosato em solos com diferentes atributos mineralógicos. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 24:947-951, 2000.
- Prata, F. Comportamento do glifosato no solo e deslocamento miscível de atrazina. Tese de doutorado. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, p149, 2002.
- Qiagen. Maximizing PCR and RT-PCR success: addressing critical factors and new solutions. Second edition, 2011.
- Regehr, DL; Bazzaz, FA. The population dynamics of *Erigeron canadensis*, a sucessional winter annual. *Journal of Ecology*, 67(3):923-933, 1979.
- Ribeiro, DN. Caracterização da resistência ao herbicida glyphosate em biótipos da planta daninha *Lolium multiflorum* (Lam.). Dissertação para a obtenção do Grau de Mestre em Agronomia. Piracicaba, 2008.
- Roberts, TR. Metabolic Pathways of Agrochemicals. Part 1: Herbicides and Plant Growth Regulators. The Royal Society of Chemistry, 1998.
- Rubim, B. Herbicide resistance in weeds and crops, progress and prospects. In: Caseley, JC; Cussans, GW; Atkin, RK. *Herbicide resistance in weeds and crops*. Oxford: Butterworth-Heinemann, p387-414, 1991.
- Sammons, RD; Gaine, TA. Glyphosate resistance: State of knowledge, 2014.
- Santos, MDFS. Controlo de *Conyza bonariensis* resistente ao glifosato. Dissertação para a obtenção do Grau de Mestre em Engenharia Agronómica (Protecção das Plantas), ISA, 2012.

- Shaner, DL; Nadler-Hassar, T; Henry, WB; Koger, CH. A rapid in vivo shikimate accumulation assay with excised leaf discs. *Weed Science*, Lawrence, 53(6):769-774, 2005.
- Shaner, DL. Role of Translocation as a Mechanism of Resistance to Glyphosate. *Weed Science*, 57, 2009.
- Shaner, DL. Testing Methods for Glyphosate Resistance. In Nandula, VK. Glyphosate Resistance in Crops and Weeds: History, Development, and Management. 2010.
- Shrestha, A; Hembree, KJ; Va, N. Growth stage influences level of resistance in glyphosate-resistant horseweed. *California agriculture*, 61(2), 2007.
- Silva, AA; Vargas, LV; Ferreira, EA. Herbicidas: resistência de plantas (capítulo 7). In: Silva, AA; Silva, JF. Tópicos em manejo integrado de plantas daninhas. UFV, 2007.
- Silva, AA; Ferreira, FA; Ferreira, LR; Santos, JB. Biologia de Plantas Daninhas (capítulo 1). In: Silva, AA; Silva, JF; *Tópicos em manejo integrado de plantas daninhas*. UFV, 2007b
- Silvertown, JW. Introduction to plant population ecology. 2. ed. New York: Longman, p220, 1987.
- Smisek, AJ. The Evolution of Resistance to Paraquat in Populations of *Erigeron canadensis*. Master thesis, University of Western Ontario, London, Ontario, Canada, p102, 1995.
- Székács, A; Darvas, B. Forty Years with Glyphosate. In: Hasaneen, MN. *Herbicides - Properties, Synthesis and Control of Weeds*. InTech, 2012.
- Theologis *et al.* Sequence and analysis of chromosome 1 of the plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature*, 408(6814):816-20, 2000.
- Tremmel, CD; Peterson, KM. Competitive subordination of a piedmont old field successional dominant by an introduced specie. *American Journal of Botany*, 70(8):1125-1132, 1983.
- Urbano, JM; *et al.* Glyphosate-resistant hairy fleabane (*Conyza bonariensis*) in Spain. *Weed technology*, 21(2):396-401, 2007.
- Vangessel, MJ. Glyphosate-resistant horseweed from Delaware. *Weed Science*, 49(3):703-705, 2001.
- Vidal, RA; Fleck, NC. Análise do risco da ocorrência de biótipos de plantas daninhas resistentes aos herbicidas. *Planta Daninha*, 15(2), 1997.
- Vidal, RA; Merotto Jr., A. Resistência de plantas daninhas aos herbicidas. Porto Alegre, p138-148, 2001.
- Vidal, RA; Lamego, FP; Trezzi, MM. Diagnóstico da resistência aos herbicidas em plantas daninhas. *Planta Daninha*, 24(3):567-604, 2006.
- Vidal, RA; Kalsing, A; Goulart, ICGR; Lamego, FP; Christoffoleti, PJ. Impacto da temperatura, irradiância e profundidade das sementes na emergência e germinação de *Conyza bonariensis* e *Conyza canadensis* resistentes ao glyphosate. *Planta Daninha*, Viçosa, 25(2):309-315, 2007.
- Vogwill, T; Lagator, M; Colegrave, N; Neve, P. The experimental evolution of herbicide resistance in *Chlamydomonas reinhardtii* results in a positive correlation between fitness in the presence and absence of herbicides. *J. Evol. Biol.*, 25:1955–1964, 2012.
- Wakelin, AM; Preston, C. A target-site mutation is presente in a glyphosate-resistant *Lolium rigidum* population. *Weed Research*, 46:432-440, 2006.
- Walker, CG; Meier, S; Mitchell, MD; Roche, JR; e Littlejohn, M. Evaluation of real-time PCR endogenous control genes for analysis of gene expression in bovine endometrium. *BMC Mol. Biol.*, 10:100, 2009.

- Weed Technology, 12(4):789, 1998.
- Wu, W; Walker, S; Rollin, MJ; Tan, DKY; Robinson, G; Werth, J. Germination, persistence, and emergence of axleaf eabane (*Conyza bonariensis* [L.] Cronquist). *Weed Biology and Management*, 7(1):192-199, 2007.
- Weaver, RF. Molecular biology. Lawrence: University of Kansas, p62-79, 2012.
- Wurzell, B. *Conyza sumatrensis* (Retz.) E. Walker established in England. *Watsonia*, 17(1):145-148, 1988.
- Yamada, T; Castro, PRC. Glifosato, herbicida com singular modo de ação: efeitos secundários e implicações fisiológicas e agrônômicas. In: Simpósio Sistema Agrícola Sustentável com Colheita Econômica Máxima. Brasil, 2004.
- Yamashita, OM. Biologia germinativa das plantas daninhas: *Conyza canadensis* L. (Cronquist) e *Conyza bonariensis* L. (Cronquist). 2010. 116f. Tese (Doutorado em Agricultura Tropical) – Universidade Federal de Mato Grosso, Cuiabá-MT (2010).
- Yamashita, OM; Guimarães, SC. Efeito do estresse salino na germinação das sementes de *Conyza canadensis* e *Conyza bonariensis*. In: XXVII Congresso Brasileiro da Ciência das Plantas Daninhas; Centro de Convenções, Ribeirão Preto, SP, 2010.
- Yamauti, MS; Barroso, AAM; Souza, MC; Alves, PLCA. Controle químico de biótipos de buva (*Conyza canadensis* e *Conyza bonariensis*) resistentes ao glyphosate. *Rev. Ciênc. Agron.*, 41(3):495-500, 2010.
- Yu, Q; Abdallah, I; Han, H; Owen, M; Powles, S. Distinct non-target site mechanisms endow resistance to glyphosate, ACCase and ALS-inhibiting herbicides in multiple herbicide-resistant *Lolium rigidum*. *Planta*, 230:713, 2009.
- Yuan, CI; Chaing, MY; Chen, IM. Triple mechanisms of glyphosate resistance in a naturally occurring glyphosate-resistant plant *Dicellaetha chinensis*. *Plant Science*, 163:543-554, 2002.
- Yuan, JS; Reed, A; Chen, F; Stewart Jr, CN. Statistical analysis of real-time PCR data. *BMC Bioinformatics*, 7:85, 2006.
- Zablotowicz, RM; Reddy, KN. Impact of glyphosate and *Bradyrhizobium japonicum* symbiosis with glyphosate-resistant transgenic soybean: a minireview. *Journal of Environmental Quality*, 33:825-831, 2004.
- Zelaya, IA; Owen, MDK; VanGessel, MJ. Inheritance of evolved glyphosate resistance in *Conyza canadensis* (L.) Cronq. *Theor Appl Genet*, 110: 58–70, 2004.
- Zelaya, IA; Owen, MDK; Vangessel, MJ. Transfer of glyphosate resistance: evidence of hybridization in *Conyza* (Asteraceae). *American Journal of Botany*, 94(4):660–673, 2007.

Anexos

Anexo I - Sequencia nucleotídica da enzima EPSPS-2 e regiões flanqueadas pelos “primers” EPS-180 e EPS-1200

EPS-1200 “forward” →

GTGTTTTCTCAACCAAAATCCCCCGCCCCCCCCACAAAACACACAATG**GCAGTTCACATCAACA**ACTCC
ACATACCCATTTTCAACACTTCCAATCTCACAACCCAAAACCCATCTTCAAAGTCATCATCTTTTTTAT
CTTTTGGATCCAACCTCAAAAACCCATTAAAAACAATAATAACAATAATTATACCTCTGTCTTCTGTAA
TGTGAAAAACAACAAAACCCATTTAAAGTATCAGCTTTCTCTGCCACTTCCACCAAGAGAAGCCATCT
AAAGCTCCAGAAGAAATTGTGTGAACCCATTCAAGAAATTTCCGGGTACGGTCCATTTACCCGGATCCA
AGTCTTTGCTAAATCGGATCCTCCTTCTTCTGCTGCCCTGTCTGAGGTATCTTTTATAAATTATGTTTTGAA
TATTGAAATTTAATTAGTGTCTTTGATTGATTGACTAGAATTGATTATTATTAAGATATAGGAAAAGATA
TGTACATTAGTTTTTGTACTGAATGTGAAAAATGTCTTAATGTAGTAACCTCACAAAGTTTTGTTTGTGATC
TATAAGTTTACTTTATAAGTTACTCTATGGGAAAAGGTTACGTAGATTTTGGTTTTCTTTGACCTCTGT
AGTTGGTATGGCCATGAGAAGAAGTAGGCCATAAAAGAGCTTTGCTTGTGAGAGGACATGACCATACTTA
GAGGACTAGGATTAGTTTAGAGGAATATGGTAGATCAGTAATCCTTTTAGGTATTTTAGGGGTAGCTAT
ATACCTTATATGTAGGAAGGTCAGGCATGATACCTTCTTATATGCTCGTATACTCGTAATTTGTTGCTCTC
AGTCCATTTGCTTGGTTTTATGCAACGGTTATGTTTATTATGTTTTTATACTGATGTCTAATATGTTCA
AATGTCCTATCTACTATGTATTGTCCATTTTGCCTAAAGTGTCTACGTGGTATGTTTGTCTACTCCCCCT
TTACTCTTAACGTAGGCAGCTCATACCCGACCAAGTATGGTTTGTCTTAACCTTTACACTCTTCCCTAC
TTTTCTCATATATGGCCGGAGGTCCTTATGGAAGCAGTCTCTCTACCTTTGGGTAGAGGCAAGATTGTCT
ACATCTCACCTCCCCCATACCTGCTCACTGTGTTGTTTGTAGTTTATTTAAAGGTGAAAGGAAAGGAGAT
GAGAGGAGAAATATATAAGATGCATTTCTTAAGATTTTTTAAAGTGTGAAAGGGAAGGAGTAGAAAGGAT
TAGAGGGGGAAGTTGATATGGATCTGCGGAAGTTTATATTATTTAGTAATATAATATTAATTTTATTAT
TATTATGATTAGGAAAGTATTGTCTTTACTTAGATATCTTATGATRTCTTTTATATATTATTAGTTAGCTT
GATCATCAAGCTATAGGATTAGTATAAAAAGAATATTAGGGTTGTAATTTCTAAAGTATGAAATATTAATC
AGAAGTTTATGTTCTTGTTTAATCAATTTAGGAGTTTACTGGTTCTCGAATACCAAGCCTATCTTTGTTA
TTGTTCTTATCATCTTGTATACAAGCCATTGGTTTCGTATCAATTGGTATCAGAGCATCGATCTTGCAACCTG
TGCTTTTCTTCAACTATGGAATCAAGGACGATCATTTGATGTTGATGCTGATGTACAGCAATACCGTGAAT
CTACTGAGGCTTGGGTGGACATAATGCATGCTCGGATCAATCGTTTTCAAGCAGCCACCGCGCATCTCA
GTTGGCCACTCAACAATTTCACTTGAGGTTTACAACCTAGGCTGGATAAAGTTGAACCAAGTTGTAGTTGGG
ACACAGCAGAAGTTGGATGCATTTGGCGGCAGTGGCAAACCAAGCCTCTACCCAGCAACCGATGATTACAG
AAGTTGTATAGCACTTTTCAACTTCAACCTTCAACCAAAACAATAAGTTTGGGTTGAAGCAATCGAAGGT
TTCACAAGCAGGGTATCCTTATCCAGACACCTTCAGATCTTGCAAGGAATAATCATCTGATGTGAACC
AAGAACGAGGAGCTGGACTAACATTCAGGACATAAGCAATGCTTATGAAGATCTGGCAGGCGATGAAAA
CGGATCCATATATGACATGAATGGGGAGAATGGGCTTAAAGGTACATGTTTTGGTTTAAAGGAATTGTGCA
AAAGCTGATGAACCTTTCTGGTTTGATACATGATTGAGTTTGTAAACAACCTTCGATATGATCAGCAAG
CTATGGAGTTTCAAGTCAGAATTTGGGATCCTGGAATTACTCGAAGGAACAATTTAAAGCAACACCTTGA
GGACAAGGTGTTTTTGGGGTGGGAGTAATGATATGGATCTGCTGGAAGTTTATATATTATAGTATTATAA
TATTAATTTTATTATTAATATGATTAGGAAAGTATTGTCTTTACTTAGATATCTTATGATGTCTTTTATA
TTATTTAGTATGCTTTGATCATCTAGCTATAGGATTAGTATAAAAAGAATATTAGGGTTGTAATTTAAAG
TATGAAATATTAATCAGAAGTTTATTGTTCTTGTTTAATCAATTTAGGAGTTTACTGGTTCTCGAATACC
AGCCTATCTTTGTTATTGTTTGATACAAGCCATTGGTTCTGATCAGAAGTTTAGTTGTTTTTGTCTCAA
AAGTTTTCCCTCATTTTTGAGGTGATTAGGAAGGAAAACCTTCTCTCCCTCTCATCTCCTTTCCCTCCCT
TAAGTCAATAGACATTAATGAATATTGGGTCATTTTGTGTTGGCTATAAGGAATGACTTACCTTAA
AACTTATAGAAATGCTGTGTTATCCAGTAAGTAATCGTTTTTTTACTATTGTCTTTTAAAGACCATTCA
TTAAGCACATAAAACAAACAACAATCCTGCTTAATCGATGTAGACTACATACATGTAGACGGACATTTTA
TCCATAAACAGCTAATTAGTCATACATAGCCAGTTATATGTTTTACATCGTGCAGTGTAACCTTCTGCC
TTTACTGCTAAGATTTTTTGTGTTTACATATATATTAGATATATAAGGTTTGTATTTTGTATGCTAACTTT
AACATTACTTTTTTTTTTATCGGGGAGTGGGTTAAAGTGGTTCTCTACCTGGTTTTAGTTTTTTAGAT
GTATATCCAAATATTATTGTTGGGTAATTTAAAGTTTGAATTTTTGTTTTTTTTTGTGAACAGTATAAA
GTTTCTGACTTTTTTGTATTTTTTGTGAGGTAAAGTCGTGAATGTGTAATTTGGTATTTGATTGATATTCT
TGATATTGTTACATAGTGAGGTGCAAGGTGCTGATGGTTTCTTAGACGGGTCATGTTTGTGTTTGTGTA
ATACATCTGTTTTTTTCTTTGATAACAAGTTATAGAAGTTGCACCCAAAAATGTTCTTGTAAAGCGATA
AAAATTTGGATAGAAAGGTGACGGTTAATGATTCGATATATTGATTTGAGTTTCCTTTTATCTATTGCATT
TTCACAAGTTCAACATTCACCCCTCGATTTTTTGTATGAATCTATGACTGAAGAAAAGGGCGATTGTTGCC
TTTTGGCAATCAGTTTTGGATTTTTATTTTGTGATGGAAGGGGTGTAGTTTCTGAACCTTAGTAGAAGA
TGATAAGCTATAGTTTCAATATTGCTTTTCTTCTTTCATCTGAAGTTTGGTTTTTCAAGGACT
ATAAAAGATGCTATTTATCACCTATGACCTATGTTATAAATAGTAAGGTATTAACCTATTAATATTGGTA
TAGTCTTGAGAAATCCATGAATTTGATGAGTTTATAGGACACATCTAACTTATGTTTCTTTTACATTAC
GATTTACATCTCTTTGCTTTGAGCTCTGATTTTAAATAGCGTTTCTATTGACATATGCAATTTCTTTGA
GTTCTCTATATAAATTTTTGTAAGCTTTCCATATGTATATACTATGAATCTGAGTGAACCTATGCTATCA
GGGACTACTGTTGTAGACAACCTTGTAAACAGTGATGATGTTTACATTACATGCTTGGAGCTTTAAGAGCT
CTAGGGTTAAATGTTGAAGAAAATAGTGCAATTAAGAGCAATCGTAGAAGGTTGTGGTGGTGATTTC
CCGTGGGTAAAGAAAGCCAAGGATGAATCCAGCTTTTTCTTGGAAATGCAGGAACAGCTATGCGT**CA**ATT
GACTGCTGCCGTTACTGCTGCCGGTGGAACTCAAGGTATTTTAACTTAGTGTTATATTCTCCTGCATTT
TATGCTGTCTCATCTCTACACATACATTTTCATGACATGTGTACCCATTTCTCTCACCTCATCATTTT
ATTTTTCTATGTGTCAATTTATATGAGTAGGAGGATTTCATCTTTCATAGGCATAAATTGTAGGAATCA
AATATCGTTTTCTTTTAACTAACATCTCTTGTATTAGCTATTATAATCCGTAGAACGTATATTAAGTTT
TTTTGTCCGATATGTAATTTTAAAGTGAATACACAAATAAAAAATTTTACCTTTCTGTTTGTGTCATGTT
TGTACATATAAATTTTGTATATATCTAAGAACTAAGATCTCTAAATATTCTTCTATTAGT
TGACACAAATTAAGGGATCACATGAAGTGAAGTCAATAGCATCCACTTGTGATAATGCTGCAATTTA

ATGCCCAAAGAAGAAATTATTGCAATTCTTATTATCATTTTATTTATGGGAGACAGTGAGTATGAATTTG
GGAATCGATAATAGAGTTGACCAACTTGGTGGTGCTGGGTAGCTAAGGTAGTGGGTAAAGTTACATTGATA
TGTAATACCCCTAAACAGTTATGAGTTTCTTCTCAGCTACATACTAGATGGTGTTCCTCGAATGAGGGAGA
GGCCAATTGGTGATCTGGTCACCGGTCTAAAACAGCTTGGTGCAAAATGTTGATTGTTCTCTCGGTACAAA
CTGCCCACCGGTTCTGTAGTTGGAAGTGGAGGCCTTCCTGGTGGAAAGGTAATCAACAATAAGATTGCT
GCATTTTAAAGTCGTAAGAATTAATTATTTGGTTCATATATGATTGGAAATTTGGTTATTTAAGAAAC
TATTAATTAGTAATGAAATATAGTTTGTGAATCTTTTGTAACTCTTCTTCCCTGGCCTTCTTATGCA
GGTGAAATTTGTCAGGATCTATAAGTAGCCAATACTTGACTTCTTTGCTTATGGCGGCTCCTCTTGCACTG
GGAGACGTAGAGATAGAAATTTAGATATAAATTGATCTCTGTACCATATGTGGAGATGACACTTAAGTTGA
TGGAGCGGTTTGGGGTTTCAGTAGAACACAGTGATACTTGGGACAGATCCATGTCCGAGGCGGTCAAAA
GTACAAGTAAGTTGATCATTTCAAAAAGTCAATYTTTACGTGAAGATCGGTCAACATCTATTTTAATCC
GATAAATCTCTTTAGGTCACCTGGAAATGCTTATGTGGAAGGTGATGCTTCAAGTGCAGTTACTTCTT

EPS-180 "forward" →

AGCTGGTGTGCCATCACTGGCGGAAGTGTACCGTGGAAG**GTTGCGGGACAAGCA**GTTTACAGGTATTA
TCCATGTGCCACCTCAAAGATATTCAAAACTAAATGTTTCTCAAGTATATATCTTCTAGTTAATTG
CAAATTTTTTTTGGCCCATACGTCTACCCATCTATAAAATTCGTCCAAAGTTGGTGACTCGGTCCAATCG
TGTAATAAGTCTCTTTTTGTTTTTTAGAAATTGACAATTTATGTCAGTTCTTGGTTATATCAACGATGTG
GGGAGTGATTTGTGCACACATTTCTAAAAGAAGGACATTTAGTCTTTTTGCTTTCTTTTGGCTCAAGATC
ATCTTCATCTTTCAAGATACTCTGCATCTATTGCAATTATCAAAGTTTGGATGCATTCTGTAACGTGTG
GTACAAGGAGGGAGACATAATATGTCATTAGTCTTATTCTTAAGCTCAATGCACACTATCACCTCTTAC
TTCTTTTTCTTTCTTTTTTTTATTAGTTTATTTAAGCTCAATGCACACTAACACTTCTCTTTATAAC
TTCAGTCAATTCATTTTAAATTTTTGAAGCTGATGGTTTTTACATTAAGATAGAACTATGTATATACAT
ATGTCATTTCACTCTTACCTATTTGCATGCTTGTGTATCTTTAATCAGGGTGATGTAATAATTTGCTGAGG

← EPS-1200 "reverse"

TCCTTGGAC**CAATGGGCGCTGAAGTAACCTG**GACAGAGAACTCTGTACGGTGAAGGGTCCGCCAAGGAA
TTCTTCCGGAAGGGGACACTTGCCTCCAGTAGATGTGAACATGAACAAAATGCCGGATGTTGCGATGACT

← EPS-180 "reverse"

CTTGCTGTGGTTGCCCTTTATGCTGATGGCCCCACTGCCATTAGAGACGGTATGTGTTAGAATTCACCAC
AGCTTTGTAATGTTAAATATATGTTAGTTTAGATTAACAAAATGACTATATGATCAGAAAAGGAAACATT
TATCTCAAATTTGGAACATAATAGTATCATACCTATATAGCAATTGAGTTTCAAAGAAATCCTTAAGG
TCGTGTTGTTTATTATACATGACTGGGTATATATTGTTTTTTGTGCTCAAGCTTTTAAAAATCACATTTG
ACTATCCTTTATTGAAAGGTTAATTTTGTTCATGTCTCATTTTAGGCAATTTACTTTTTATCAAGGAAAA
AATAGCAATCAATGTCTATGGTCGTAGTTTAGGCAATTAACCCATCAATCAAAGTGCTGTTGGTTCAA
GGCATATTTAGAGATAAATGGAGATAATAGTACGTGGATGTCTTTTCAAAGAAGTACAACTTTTTCTT
GGGCTCTTTAGTTTTTACTGAAAAATACCAAACCTCTTAACTGAATTGTCTAAAAATAGAAGAACTGGAA
ATTAGTTGCTATTTTGTGAAACGAAAAGTAAATCGCCAAAATTTGGAGGTTAAGTATGCTTATATTTTA
TGTAATTCATCTTTTGA AAAATGTAAGAACTTAAATGGAAGTGAATTGATTTGAAAAATATATATTA
GCACCACTTATGAGAAATCTAGAAATGAGTTTATGATCTGTAAAGACATCCTGTATATGTAATGAGA
ATAGATATATCGTACACCACAATCCATCTTTTACTTTTTCACACGACAAAGTGAATATGAAAAATGAGT
AGTTAAACACTTAAAGGCAGTTTGGGTGTGCAAGTAAATGTAGCACAAATGGCCCCCTTTCTCAT
ATTGGGTTTACATATTTCTCTTTACGTATATCCCTATATTGTTTCATTTTGTGGGCCCCATCTCACGTCGG
TAAATCATTAGATGGACTAAATCATATCTTCATTCCTTATATTGGGAGTGGCTAGCTGGAGAGTAAAA
GAAACGGAAAGGATGATTGCCATCTGCACAGAACTAAGAAAGGTACAAGTCATTACCCATCTTACTCTA
AAAAATAGAAATGGCCATGAGTACTTTTAAAGTACTCAATGAATCTGCCCATTAATTTGTTTAGTGCTAATA
GGCCCTTTTGGCCTTGGAACTTTTCAGTTGGGAGCAACAGTCGAAGAAGTCCAGATTATTTGTGTGATCA
CTCCACCAGAGAAATGAATGTGACAGCAATCGACACATACGATGATCACAGAATGGCCATGGCTTTCTC
GCTTGCCCGCTGTGCAGAGGTTCTGTCAACATTAAGGACCCGGGTTGCACCCGTAAGACCTTCCCGAC
TACTTTGAAGTTCTTGAAGATACACTAAGCATTAAATCACATATAAGATGTTTCAAGAAAGAAAGGGTTA
GAGGTTTTTAAATGACACCTTTACCTTCAGTCTTCACCATTAATCTTTCTTCAAGAAATGTTTCACTTAC
AGAGTTACATCATATGTATATGGGCGACCTGAGCGTATTTTATC

Anexo II - Extração de DNA pelo método de CTAB

Após macerar folhas de S e B4, pesaram-se cerca de 70 a 100 mg destas amostras teste (folhas maceradas) para dois tubos de 2 mL. Em cada tubo, procedeu-se da seguinte forma:

- Adicionar 300 µL de água destilada desionizada e misturar
- Adicionar 500 µL de tampão de extração de CTAB, pré-aquecido no micro-ondas e misturar
- Adicionar 20 µL de solução de Proteinase K (20 mg L⁻¹) e misturar suavemente
- Incubar a 65 °C durante 30 min, com agitação
- Adicionar 20 µL da solução de RNase (10mg mL⁻¹) e misturar muito suavemente
- Incubar a 65 °C durante 5 min, com agitação
- Centrifugar a 13000 rpm durante 10 min

- Transferir o sobrenadante para um novo tubo contendo 500 µL de clorofórmio
- Misturar durante 30 s em vortex
- Centrifugar a 13000 rpm durante 15 min
- Transferir 600µL o sobrenadante para um novo tubo de reação de 1,5mL contendo 500 µL

de clorofórmio

- Misturar durante 10 s em vortex
- Centrifugar a 13000 rpm durante 5 min
- Transferir o sobrenadante para um novo tubo de reação de 2 mL
- Adicionar 2 volumes do tampão de precipitação de CTAB e misturar
- Incubar durante 30 min à temperatura ambiente
- Centrifugar a 13000 rpm durante 10 min e decantar o sobrenadante
- Dissolver o DNA precipitado em 350 µL da solução de NaCl (1,2M)
- Adicionar 350 µL de clorofórmio e misturar no vortex durante 30 s
- Centrifugar a 13000 rpm durante 10 min
- Transferir a fase aquosa para um novo tubo de 1,5 mL
- Adicionar 0,6 volumes de isopropanol (180 µL) e misturar suavemente por inversão
- Centrifugar a 13000 rpm durante 10 min e eliminar o sobrenadante
- Juntar 500 µL de etanol (70%) a -20 °C e inverter o tubo várias vezes para completa

remoção do CTAB

- Centrifugar a 13000 rpm durante 10 min + 5 min e eliminar o sobrenadante
- Secar ao ar o precipitado de DNA
- Dissolver em 100 µL de tampão TE
- Deixar a solução durante 24 h à temperatura ambiente
- Homogeneizar a solução de DNA 20 min a 37 °C

Anexo III - Formulação do tampão TAE

TAE 50x concentrado

- 242 g Tris (hidroximetil aminometano)
- 57,1 mL de Ácido acético glacial
- 100 mL de EDTA 0,5 M (pH 8,0) (ver IT 12C / 10,4)

Misturar tudo dentro de um copo de precipitação de 1 L de capacidade até dissolver na totalidade.

Passar tudo para uma proveta de 1 L.

Adicionar água destilada até perfazer 1 L. Conservar a cerca de 4 °C até o máximo de um ano.

TAE 1x concentrado

Medir 20 mL de tampão TAE (50 x) e adicionar água destilada até perfazer 1 L.

Conservar a cerca 4°C ou usar de imediato.

Anexo IV - Alinhamento completo das sequências codificantes

Os alinhamentos foram efetuados com recurso à ferramenta bioinformática CLUSTALW, da “Kyoto University Bioinformatics Center”.

Zea_mays_X63374.1	-----
Sorghum_halepense_HQ436354.1	-----
Eleusine_indica_AJ417034.1	-----
Arabidopsis_thaliana_AK227120.	CTCCAATCTCTCGAAATCCAGTCAACGCAAATCTCCCTTATCGGTTTCTC
RES_REV_CR	-----
SEN_REV_CR	-----
RES_FOR	---AACCCATCTTCAAAGTCATCATCTTTTTTATCTTTTGGATCCAACCTT
SEN_FOR	-AAAACCCATCTTCAAAGTCATCATCTTTTTTATCTTTTGGATCCAACCTT
Zea_mays_X63374.1	-----
Sorghum_halepense_HQ436354.1	-----
Eleusine_indica_AJ417034.1	-----
Arabidopsis_thaliana_AK227120.	TGAAGACGCAGCAGCATCCACGAGCTTATCCGATTTTCGTCGTCGTGGGGA
RES_REV_CR	-----
SEN_REV_CR	-----
RES_FOR	CAAAAACCCATTAAAAACAATAATAACAATAATTATACCTCTGTTTCTT
SEN_FOR	CAAAAACCCATTAAAAACAATAATAACAATAATTATACCTCTGTTTCTT
Zea_mays_X63374.1	-----
Sorghum_halepense_HQ436354.1	-----
Eleusine_indica_AJ417034.1	-----
Arabidopsis_thaliana_AK227120.	TTGAAGAAGAGTGGGATGACGTTAATTGGCTCTGAGCTTCGTCCTCTTAA
RES_REV_CR	-----
SEN_REV_CR	-----
RES_FOR	GTAATGTGAAAAACAACAAAACCCATTTAAAGTATCAGCTTTCTCTGCC
SEN_FOR	GTAATGTGAAAAACAACAAAACCCATTTAAAGTATCAGCTTTCTCTGCC
Zea_mays_X63374.1	-----GCGGGTGCCGAGGAGATCGTGCTGC
Sorghum_halepense_HQ436354.1	-----GCGGGCGCCGAGGAGATCGTGCTGC
Eleusine_indica_AJ417034.1	-----GCGGGCGCGGAGGAGGTGGTGCTGC
Arabidopsis_thaliana_AK227120.	GGTCATGTCTTCTGTTTCCACGCGGAGAAAGCGTCGAGATTGTACTTC
RES_REV_CR	-----
SEN_REV_CR	-----
RES_FOR	ACTTCCACCAAAGAGAAGC-CATCTAAAGCTCCAGAAGAAATTGTGTTGA
SEN_FOR	ACTTCCACCAAAGAGAAGC-CATCTAAAGCTCCAGAAGAAATTGTGTTGA
Zea_mays_X63374.1	AGCCCATCAAGGAGATCTCCGGCACCGTCAAGCTGCCGGGGTCCAAGTCG
Sorghum_halepense_HQ436354.1	AGCCCATCAAGGAGATCTCCGGCACCGTCAAGCTGCCGGGGTCCAAGTCG
Eleusine_indica_AJ417034.1	AGCCCATCAAGGAGATCTCCGGCGTCGTGAAGCTGCCGGGGTCCAAGTCG
Arabidopsis_thaliana_AK227120.	AACCCATTAGAGAAATCTCCGGTCTTATTAAGCTTCTGGCTCCAAGTCT
RES_REV_CR	-----
SEN_REV_CR	-----
RES_FOR	AACCCATTCAAGAAATTTTCGGGTACGGTCCATTTACCCGGATCCAAGTCT
SEN_FOR	AACCCATTCAAGAAATTTTCGGGTACGGTCCATTTACCCGGATCCAAGTCT
Zea_mays_X63374.1	CTTTCCAACCGGATCCTCCTACTCGCCGCCCTGTCCGAGGGGACAACAGT
Sorghum_halepense_HQ436354.1	CTGTCCAACCGGATCCTCCTGCTCGCCGCCCTGTCCGAGGGGACAACAGT
Eleusine_indica_AJ417034.1	CTCTCCAACCGGATCCTCCTGCTCTCCGCCCTCGCCGAGGGGAACAACAGT
Arabidopsis_thaliana_AK227120.	CTATCAAATCGGATCCTGCTTCTCGCTGCTCTGCTGAGGGAACAACAGT
RES_REV_CR	-----TGAGGGGACTACTGT
SEN_REV_CR	-----

RES_FOR	TTGTCTAATCGGATCCTCCTTCTTGCTGCCCTGTCTGAGGGGACTACTGT
SEN_FOR	TTGTCTAATCGGATCCTCCTTCTTGCTGCCCTGTCTGAGGGGACTACTGT
Zea_mays_X63374.1	GGTTGATAACCTGCTGAACAGTGAGGATGTCCACTACATGCTCGGGGCCT
Sorghum_halepense_HQ436354.1	GGTTGATAACCTGTTGAACAGTGAGGATGTTCCTACTACATGCTTGGGGCCT
Eleusine_indica_AJ417034.1	GGTGATAACCTTTTAAACAGTGAGGACGTCCACTACATGCTCGGGGCCC
Arabidopsis_thaliana_AK227120.1	AGTGGACAACCTTGTGAATAGCGATGACATCAATTACATGCTTGATGCGT
RES_REV_CR	TGTAGACAACCTTGTTAAACAGTGATGATGTTTCATTACATGCTTGGAGCTT
SEN_REV_CR	-----TAAACAGTGATGATGTTTCATTACATGCTTGGAGCTT
RES_FOR	TGTAGACAACCTTGTTAAACAGTGATGATGTTTCATTACATGCTTGGAGCTT
SEN_FOR	TGTAGACAACCTTGTTAAACAGTGATGATGTTTCATTACATGCTTGGAGCTT
	* * * * *
Zea_mays_X63374.1	TGAGGACTCTTGGTCTCTCTGTGCGAAGCGGACAAAGCTGCCAAAAGAGCT
Sorghum_halepense_HQ436354.1	TGAACACTCTTGGGCTCTCTGTGCGAAGCAGACAAAGTTGCCAAAAGAGCT
Eleusine_indica_AJ417034.1	TGAAAACCCCTCGGACTCTCTGTGGAAGCGGACAAAGCTGCCAAAAGAGCA
Arabidopsis_thaliana_AK227120.1	TGAAGAGATTGGGACTTAATGTGGAAGTACAGTGAAAATAATCGTGCT
RES_REV_CR	TAAGAGCTCTAGGGTTAAATGTTGAAGAAAATAGTGAATTTAAAGAGCA
SEN_REV_CR	TAAGAGCTCTAGGGTTAAATGTTGAAGAAAATAGTGAATTTAAAGAGCA
RES_FOR	TAAGAGCTCTAGGGTTAAATGTTGAAGAAAATAGTGAATTTAAAGAGCA
SEN_FOR	TAAGAGCTCTAGGGTTAAATGTTGAAGAAAATAGTGAATTTAAAGAGCA
	* * * * *
Zea_mays_X63374.1	GTAGTTGTTGGCTG-TGGTGGAAAGTTCCAGTTGAG---GATGCTAAAG
Sorghum_halepense_HQ436354.1	GTTGTTGTTGGCTG-TGGTGGAAAGTTCCAGTTGAG---GACGCTAAAG
Eleusine_indica_AJ417034.1	GTAGTTGTTGGCTG-TGGTGGCAAGTTCCAGTTGAGAAGGATGCGAAAG
Arabidopsis_thaliana_AK227120.1	GTAGTTGAAGGATG-TGGCGGGATATTCCAGCTTCCATAGATTCAAAGA
RES_REV_CR	ATCGTAGAAGGTTG-TGGTGGTGTATTTCCCGTGGGTAAAGAAGCCAAGG
SEN_REV_CR	ATCGTAGAAGGTTG-TGGTGGTGTATTTCCCGTGGGTAAAGAAGCCAAGG
RES_FOR	ATCGTAGAAGGTTG-TGGTGGTGTATTTCCCGTGGGTAAAGAAGCCAAGG
SEN_FOR	ATCGTAGAAGGTTG-TGGTGGTGTATTTCCCGTGGGTAAAGAAGCCAAGG
	* * * * *
Zea_mays_X63374.1	AGGAAGTGCAGCTCTT-CTTGGGGAATGCTGGAAGTGAATGCGGCCATT
Sorghum_halepense_HQ436354.1	AGGAAGTGCAGCTCTT-CTTGGGGAATGCTGGAAGTGAATGCGGCCATT
Eleusine_indica_AJ417034.1	AGGAGGTGCAGCTCTT-CTTGGGGAATGCTGGAAGTGAATGCGGCCATT
Arabidopsis_thaliana_AK227120.1	GTGATATCGAAGCTTTA-CCTCGGTAATGCAGGAACAGCAATGCGTCCACT
RES_REV_CR	ATGAAATCCAGCTTTTCTTTTGGAAATGCAGGAACAGCTATGCGTCCATT
SEN_REV_CR	ATGAAATCCAGCTTTTCTTTTGGAAATGCAGGAACAGCTATGCGTCCATT
RES_FOR	ATGAAATCCAGCTTTTCTTTTGGAAATGCAGGAACAGCTATGCGTCCATT
SEN_FOR	ATGAAATCCAGCTTTTCTTTTGGAAATGCAGGAACAGCTATGCGTCCATT
	* * * * *
Zea_mays_X63374.1	GACAGCAGCTGTTACTGCTGCTGGTGGAAATGCAACTTACGTGCTTGATG
Sorghum_halepense_HQ436354.1	GACAGCAGCTGTTACTGCTGCTGGTGGAAATGCAACTTACGTGCTTGATG
Eleusine_indica_AJ417034.1	GACAGCAGCCGTAAGTCTGCTGCTGGAGGAAATGCAACTTATGTGCTTGATG
Arabidopsis_thaliana_AK227120.1	TACCGCTGCGGTCACTGCTGCAGGTGGAACGCAAGTTATGTGCTTGATG
RES_REV_CR	GACTGCTGCCGTTACTGCTGCCGGTGGAACTCAAGCTACATACTAGATG
SEN_REV_CR	GACTGCTGCCGTTACTGCTGCCGGTGGAACTCAAGCTACATACTAGATG
RES_FOR	GACTGCTGCCGTTACTGCTGCCGGTGGAACTCAAGCTACATACTAGATG
SEN_FOR	GACTGCTGCCGTTACTGCTGCCGGTGGAACTCAAGCTACATACTAGATG
	* * * * *
Zea_mays_X63374.1	GAGTACCAAGAATGAGGGAGAGACCCATTGGCGACTTGGTTGTCGGATTG
Sorghum_halepense_HQ436354.1	GAGTACCAAGAATGAGGGAGAGACCCATCGGCGACTTGGTTGTCGGATTG
Eleusine_indica_AJ417034.1	GAGTGCCAAGAATGCGGGAGAGACCCATTGGCGACTTGGTTGTCGGATTG
Arabidopsis_thaliana_AK227120.1	GGGTGCCTCGTATGAGAGAAAGACCTATAGGGGATTTGGTTGTTGGTCTT
RES_REV_CR	GTGTTCCCTCGAATGAGGGAGAGGCCAATTGGTGATCTGGTCACCGGTCTA
SEN_REV_CR	GTGTTCCCTCGAATGAGGGAGAGGCCAATTGGTGATCTGGTCACCGGTCTA
RES_FOR	GTGTTCCCTCGAATGAGGGAGAGGCCAATTGGTGATCTGGTCACCGGTCTA
SEN_FOR	GTGTTCCCTCGAATGAGGGAGAGGCCAATTGGTGATCTGGTCACCGGTCTA
	* * * * *
Zea_mays_X63374.1	AAGCAGCTTGGTGCAGATGTTGATTGTTTCCTTGGCACTGACTGCCACC
Sorghum_halepense_HQ436354.1	AAGCAGCTTGGTGCAGATGTTGATTGTTTCCTTGGCACTGACTGCCACC
Eleusine_indica_AJ417034.1	AAACAGCTTGGTGCAGATGTTGATTGTTTCCTTGGCACTGACTGCCACC
Arabidopsis_thaliana_AK227120.1	AAGCAGCTTGGTGCAGATGTTGATTGTTTCCTTGGCACTGACTGCCACC
RES_REV_CR	AAACAGCTTGGTGCAGATGTTGATTGTTTCCTTGGTACAAACTGCCACC
SEN_REV_CR	AAACAGCTTGGTGCAGATGTTGATTGTTTCCTTGGTACAAACTGCCACC
RES_FOR	AAACAGCTTGGTGCAGATGTTGATTGTTTCCTTGGTACAAACTGCCACC
SEN_FOR	AAACAGCTTGGTGCAGATGTTGATTGTTTCCTTGGTACAAACTGCCACC

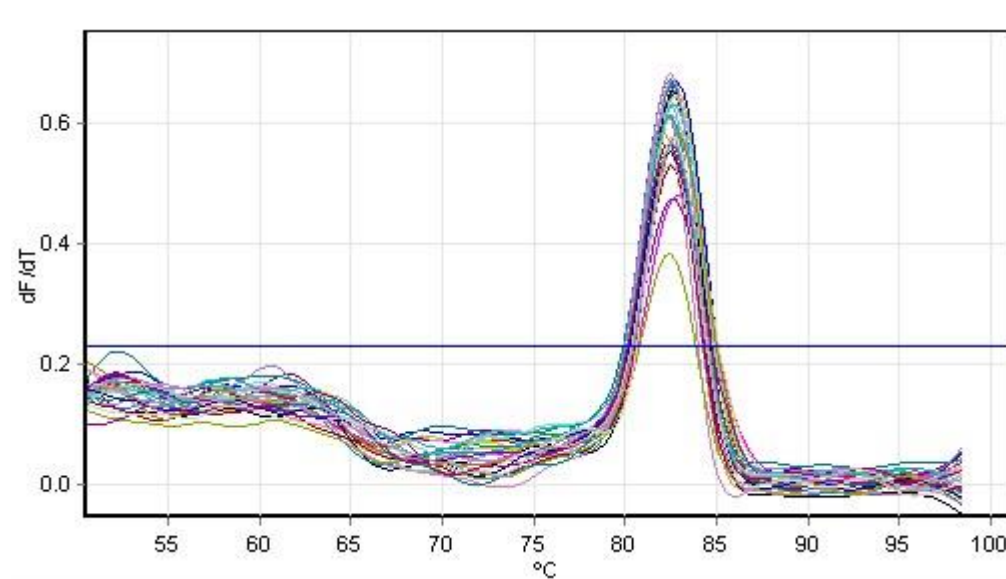
	<p> ** ***** * ***** ** ** * * ***** *</p>
<p> Zea_mays_X63374.1 Sorghum_halepense_HQ436354.1 Eleusine_indica_AJ417034.1 Arabidopsis_thaliana_AK227120. RES_REV_CR SEN_REV_CR RES_FOR SEN_FOR</p>	<p> TGTTTCGTGTCAATGGAATCGGAGGGCTACCTGGTGGCAAGGTCAAGCTGT CGTTTCGTATCAATGGAATTGGAGGGCTACCTGGCGGCAAGGTTAAGCTCT TGTTTCGTGTCAAGGGAATCGGAGGGCTACCTGGTGGCAAGGTTAAGTTAT TGTTTCGTGTCAACGCTAATGGTGGCCTTCCCGGTGGAAAGGTGAAGCTTT GGTTTCGTGTAGTTGGAAGTGGAGGCCTTCCTGGTGGAAAGGTGAAATTGT GGTTTCGTGTAGTTGGAAGTGGAGGCCTTCCTGGTGGAAAGGTGAAATTGT GGTTTCGTGTAGTTGGAAGTGGAGGCCTTCCTGGTGGAAAGGTGAAATTGT ***** * * * * * * * * *</p>
<p> Zea_mays_X63374.1 Sorghum_halepense_HQ436354.1 Eleusine_indica_AJ417034.1 Arabidopsis_thaliana_AK227120. RES_REV_CR SEN_REV_CR RES_FOR SEN_FOR</p>	<p> CTGGCTCCATCAGCAGTCAGTACTTGAGTGCCTTGCTGATGGCTGCTCCT CTGGCTCCATCAGCAGTCAGTACTTGAGTGCCTTGCTGATGGCTGCTCCT CTGGTTCCATCAGCAGTCAGTACTTGAGTGCCTTGCTGATGGCTGCTCCT CTGGATCAATTAGTAGTCAGTACTTGACTGCTCTGCTCATGTCTGCTCCC CAGGATCTATAAGTAGCCAATACTTGACTTCTTTGCTTATGGCGGCTCCT CAGGATCTATAAGTAGCCAATACTTGACTTCTTTGCTTATGGCGGCTCCT ----- CAGGATCTATAAGTAGCCAATACTTGACTTCTTTGCTTATGGCGGCTCCT</p>
<p> Zea_mays_X63374.1 Sorghum_halepense_HQ436354.1 Eleusine_indica_AJ417034.1 Arabidopsis_thaliana_AK227120. RES_REV_CR SEN_REV_CR RES_FOR SEN_FOR</p>	<p> TTGGCTCTTGGGGATGTGGAGATTGAAATCATTGATAAATTAATCTCCAT TTGGCTCTTGGGGATGTGGAGATTGAAATCATTGATAAATTAATCTCCAT TTAGCTCTTGGGGATGTGGAGATTGAAATCATTGATAAATTAATCTCCAT TTAGCTCTTGAGACGTCGAGATTGAGATTGTCGATAAATTAATTTCTGT CTTGCACTGGGAGACGTAGAGATAGAAATTGTAGATAAATTGATCTCTGT CTTGCACTGGGAGACGTAGAGATAGAAATTGTAGATAAATTGATCTCTGT ----- CTTGCACTGGGAGACGTANAGATAGAAATTGTANATAAATTGATCTCTGT</p>
<p> Zea_mays_X63374.1 Sorghum_halepense_HQ436354.1 Eleusine_indica_AJ417034.1 Arabidopsis_thaliana_AK227120. RES_REV_CR SEN_REV_CR RES_FOR SEN_FOR</p>	<p> TCCGTACGTCGAAATGACA-TTGAGATTGATGGAGCGTTTTGGTGTGAAA TCCTATGTCGAAATGACA-TTGAGATTGATGGAACGTTTTGGCGTGAAA CCCTTATGTTGAAATGACA-TTGAGATTATGGAGCGTTTTGGCGTGAAA TCCATATGTTGAAATGACA-TTGAAGTTGATGGAACGTTTCGGGGTTAGT ACCATATGTGGAGATGACA-CTTAAGTTGATGGAGCGTTTTGGGGTTTCA ACCATATGTGGAGATGACA-CTTAAGTTGATGGAGCGTTTTGGGGTTTCA ----- ACCATATGTGGAGATGACACTTTAAGTTGATGGAGCGTTTTGGGG-----</p>
<p> Zea_mays_X63374.1 Sorghum_halepense_HQ436354.1 Eleusine_indica_AJ417034.1 Arabidopsis_thaliana_AK227120. RES_REV_CR SEN_REV_CR RES_FOR SEN_FOR</p>	<p> GCAGAGCATTCTGATAGCTGGGACAGATTCTACATTAAGGGAGGTCAAAA GCAGAGCATTCTGATAGCTGGGACAGATTCTACATTAAGGGAGGTCAAAA GCAGAGCATTCTGATAGCTGGGACAGATTCTACATCAAGGGAGGTCAAAA GTCGAGCATAGTATAGCTGGGATCGTTTCTTTGTCAAGGGCGGGCAAAA GTAGAACACAGTGATACTTGGGACAGATTCCATGTCCGAGGCGGTCAAAA GTAGAACACAGTGATACTTGGGACAGATTCCATGTCCGAGGCGGTCAAAA ----- -----</p>
<p> Zea_mays_X63374.1 Sorghum_halepense_HQ436354.1 Eleusine_indica_AJ417034.1 Arabidopsis_thaliana_AK227120. RES_REV_CR SEN_REV_CR RES_FOR SEN_FOR</p>	<p> ATACAAGTCCCCTAAAAATGCCTATGTTGAAGGTGATGCCTCAAGCGCAA ATACAAGTCCCCCAAAAATGCCTATGTTGAAGGTGATGCCTCAAGTGCAA ATACAAGTCCCCTAAAAATGCCTACGTGGAAGGTGATGCCTCAAGTGCGA ATACAAGTCTCCGGTAATGCGTATGTAGAAGGTGATGCTTCTAGTGCTA GTACAAGTCACTGGAAATGCTTATGTGGAAGGTGATGCTTCAAGTGCGA GTACAAGTCACTGGAAATGCTTATGTGGAAGGTGATGCTTCAAGTGCGA ----- -----</p>
<p> Zea_mays_X63374.1 Sorghum_halepense_HQ436354.1 Eleusine_indica_AJ417034.1 Arabidopsis_thaliana_AK227120. RES_REV_CR SEN_REV_CR RES_FOR SEN_FOR</p>	<p> GCTATTTCTTGGCTGGTGCTGCAATTACTGGAGGGACTGTGACTGTGGAA GCTATTTCTTGGCTGGTGCTGCAATTACTGGAGGGACTGTGACTGTGGAA GCTATTTCTTGGCTGGTGCTGCAATCACTGGAGGGACTGTGACTGTGGAA GTTATTTCTTGGCTGGTGCTGCCATTACCGGTGAAACTGTCACAGTCGAA GTTACTTCTTAGCTGGTGCTGCCATCACTGGCGGAACTGTCACCGTGGAA GTTACTTCTTAGCTGGTGCTGCCATCACTGGCGGAACTGTCACCGTGGAA ----- -----</p>

Zea_mays_X63374.1	GGTTGTGGCACCACCAGTTTGCAGGGTGATGTGAAGTTTGCTGAGGTACT
Sorghum_halepense_HQ436354.1	GGTTGTGGCACCACCAGTTTGCAGGGTGATGTGAAATTTGCTGAGGTACT
Eleusine_indica_AJ417034.1	GGTTGTGGCACCACCAGTCTGCAGGGTGATGTGAAATTTGCCGAGGTACT
Arabidopsis_thaliana_AK227120.	GGTTGTGGAACCTACCAGCTTGCAGGGAGATGTAAAATTCGCCGAGGTCCCT
RES_REV_CR	GGTTGCGGGACAAGCAGTT-----
SEN_REV_CR	GGTTGCGGGACAAGCAGTTTACAGGGTGA-----
RES_FOR	-----
SEN_FOR	-----

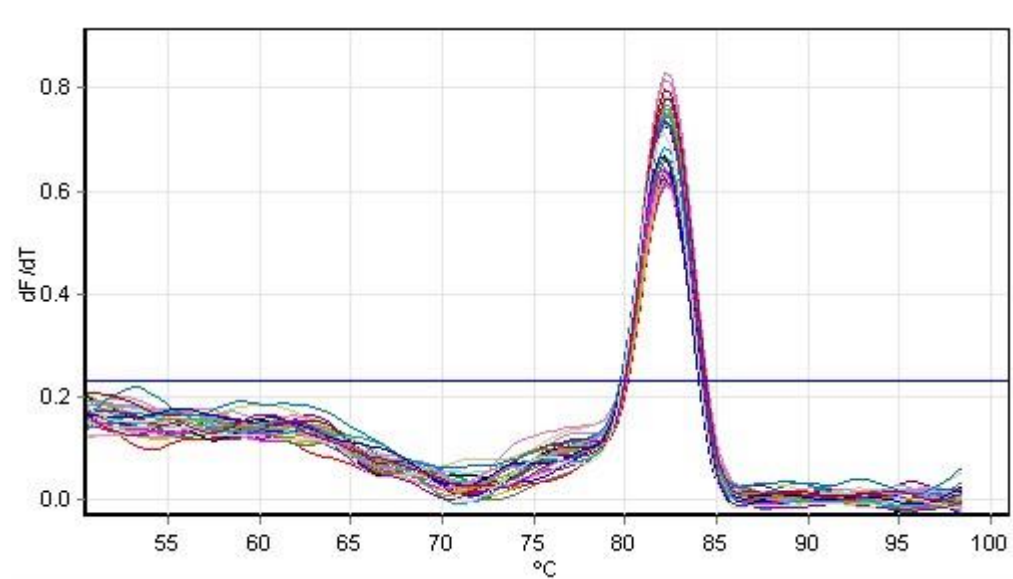
Anexo V - Curvas de “melting”

1. Ensaio 1

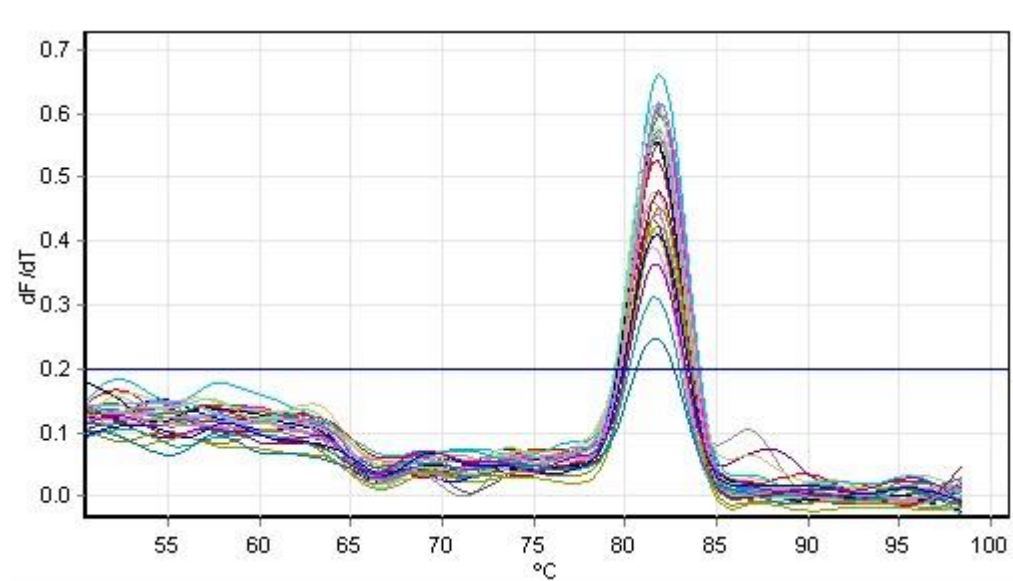
1.1. Amplificação com os “primers” *EPS-180*



1.2. Amplificação com os “primers” EF-1

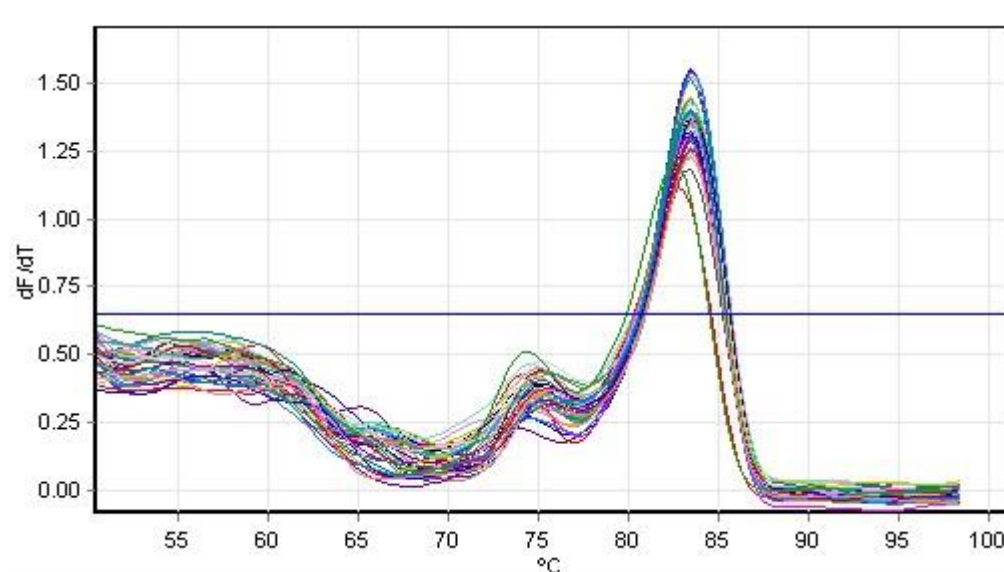


1.3. Amplificação com os “primers” 18S

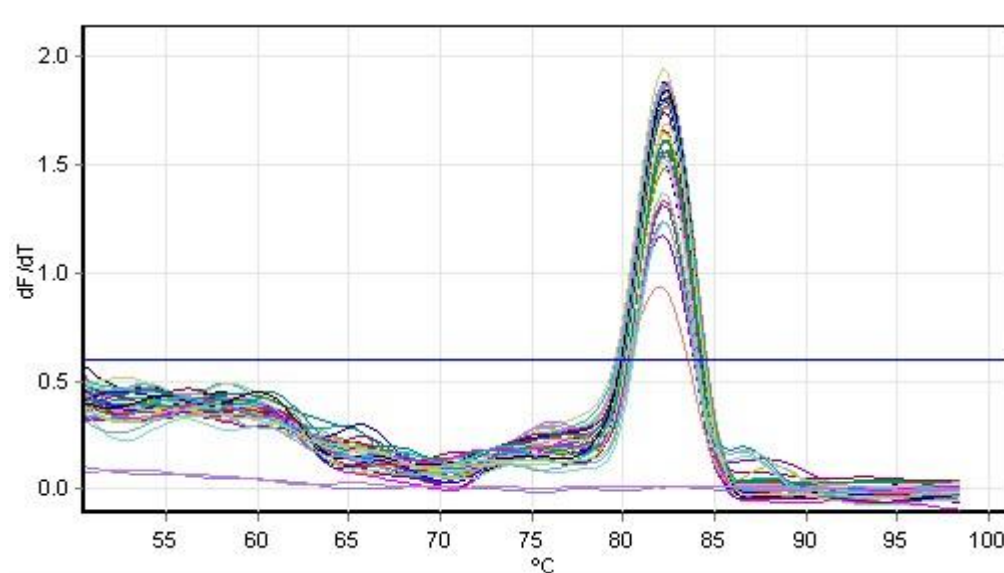


2. Ensaio 2

2.1. Amplificação com os “primers” *EPS-1200*



2.2. Amplificação com os “primers” *EF-1*



Anexo VI – Eficiência das PCR em tempo real

	Ensaio 1			Ensaio 2	
“Primers”	EPS-180	EF-1	18S	EPS-1200	EF-1
Eficiência da reação	0,85773	1,02797	0,98172	0,97931	1,06078
r²	0,99341	0,98101	0,99302	0,99156	0,98054